ISOLIERUNG, KULTUR UND FUSION VON PROTOPLASTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gisela Gosch
aus Hamburg

Berlin 1976

ISOLIERUNG, KULTUR UND FUSION VON PROTOPLASTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gisela Gosch
aus Hamburg

Berlin 1976

ISOLIERUNG, KULTUR UND FUSION VON PROTOPLASTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Gisela Gosch
aus Hamburg

Berlin 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof. Dr. J. Reinert
2. Referent: Prof. Dr. H. Clauss
Tag der mündlichen Prüfung 12. Oktober 1976

I N H A L T

1. EINLEITUNG 5

2. MATERIAL UND METHODEN 9

3. ERGEBNISSE 15

3.1. Isolierung und Kultur von Protoplasten verschiedener Species

3.1.1. Daucus carota 15
Einfluß der Temperatur 17
Molarität und Zusammensetzung des Mediums 22

3.1.2. Atropa belladonna 23
Protoplastendichte 27
Auxinkonzentration des Kulturmediums 29

3.1.3. Mesophyllprotoplasten von Nicotiana tabacum und Petunia hybrida 30
Ausbeute und Größe 33
Plattierungseffizienz 35
Organogenese 39

3.2. Fusionen von Protoplasten

3.2.1. Ermittlung einer optimalen Fusionsmethode 43
Vergleich verschiedener Fusionsmittel 43
Konzentration der PEG Lösung 44
Einfluß der Zeit nach der Protoplastenisolierung 45
Dauer der PEG Behandlung 46
Einfluß des Auswaschens der PEG Lösung 47
pH Wert der PEG Lösung 48

3.2.2. Kultur von Heterokaryonten 49
Konsistenz und Zusammensetzung des Mediums 49
Protoplastendichte 51
Cytologische Untersuchungen 55

4. DISKUSSION 64

5. ZUSAMMENFASSUNG 99

6. LITERATURVERZEICHNIS 101

1. EINLEITUNG

Schon 1892 war es Klercker erstmalig gelungen, Protoplasten auf mechanischem Wege durch Anschneiden plasmolysierter Zellen zu isolieren. Er konnte jedoch nur eine sehr geringe Ausbeute erhalten. Erst durch die Versuche von Cocking (1960), Protoplasten durch enzymatischen Abbau der Zellwand zu isolieren, standen diese in ausreichender Menge für vielversprechende experimentelle Ansätze der Pflanzenphysiologie, Genetik und Züchtungsforschung zur Verfügung.

Protoplasten haben gegenüber isolierten Zellen große Vorteile. Sie können fusioniert werden, und durch Kombination genetisch unterschiedlichen Materials eröffnet sich die Möglichkeit, somatische Hybride sexuell inkompatibler Pflanzenspecies aufzuziehen (Nickell und Torrey 1969, Power, Cummins und Cocking 1970, Schenk und Hildebrandt 1971, Potrykus 1972, Gamborg et al. 1973 u.a.). Dieses kann für die Züchtung von Nutz- und auch Arzneipflanzen von großer Bedeutung sein und zur Lösung vieler wirtschaftlicher, wie auch biochemischer Probleme beitragen.

Weitere interessante Aspekte ergeben sich durch die Fähigkeit der Protoplasten, Mikro- und Makromoleküle (Mayo und Cocking 1969), Bakterien (Davey und Cocking 1972), Viren (Aoki und Takebe 1969), Zellorganellen in Form von Chloroplasten (Giles und Sarafis 1971, Carlson 1973, Potrykus 1973) und Kernen (Potrykus und Hoffmann 1973) und auch isolierte DNS aufzunehmen (Hoffmann 1973). Die Inkorporation stickstoffixierender Bakterien könnte z.B. eine Steigerung der Proteinsynthese in Getreidepflanzen bewirken, die Einführung selektiver Gene Krankheitsresistenz hervorrufen

und unzureichende Photosynthese könnte durch Inkorporation von Chloroplasten in die Protoplasten ausgeglichen werden.

Diese weitreichenden Möglichkeiten können aber nur von Bedeutung sein, wenn auch Methoden entwickelt werden, welche die Protoplasten zur Zellwandbildung, Zellteilung und Regeneration intakter Pflanzen anregen. Die Fähigkeit isolierter Pflanzenzellen, durch Veränderung der Zusammensetzung des Kulturmediums morphogenetisch aktiv zu werden (White 1939, Skoog 1944 und Reinert 1958), und ganze Pflanzen zu regenerieren (Steward 1958) ist daher für die angesprochenen Aspekte von grundlegender Bedeutung. Bisher war es jedoch nur bei einer geringen Anzahl von Arten möglich, ausgehend von Protoplasten höherer Pflanzen eine Regeneration intakter Pflanzen zu induzieren (Takebe et al. 1971, Grambow et al. 1972, Durand et al. 1973, Bui- Dang- Ha und Mackenzie 1973, Kartha et al. 1974, Vardi et al. 1975 und Gosch, Bajaj und Reinert 1975 b). Für weiterführende Versuche ist es also eine wichtige Voraussetzung, für Protoplasten solche Isolierungs- und Kulturbedingungen zu ermitteln, welche die morphogenetische Aktivität der Zellen nicht verhindern. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, solche Bedingungen für Daucus carota-, Atropa belladonna-, Petunia hybrida-, und Nicotiana tabacum-Protoplasten zu ermitteln.

Eine weitere Voraussetzung für die Aufzucht somatischer Hybridpflanzen ist auch, daß Protoplasten unter reproduzierbaren Bedingungen fusionieren.
Nachdem Küster (1909) unkontrollierbare, spontane Fusionen beobachten konnte, haben viele Wissenschaftler versucht, mechanische und auch chemische Methoden zur Induk-

tion der Fusion von Protoplasten verschiedener Species zu ermitteln. Michel (1939) und Schenk und Hildebrandt (1971) wendeten mechanische Methoden an. Die Protoplasten wurden in Mikromanipulatoren und Mikropipetten in Kontakt gebracht, doch war auf diese Weise nur eine geringe Anzahl fusionierter Zellen zu erzielen. Erst die Arbeit von Power, Cummins und Cocking (1970), in der es gelang, enzymatisch isolierte Protoplasten verschiedener Species mit Hilfe einer $NaNO_3$ - Saccharoselösung zu agglutinieren und fusionieren, setzte einen Meilenstein auf dem Wege zur somatischen Hybridisierung von Pflanzen. Eine weitere Methode, durch die eine große Anzahl fusionierter Zellen zu erzielen ist, wurde von Keller und Melchers (1973) erarbeitet. Die besten Ergebnisse aber konnten bisher mit der von Kao und Michayluk und gleichzeitig Wallin, Glimelius und Eriksson (1974) beschriebenen Methode erzielt werden. Sie verwendeten Polyäthylenglykol des Molekulargewichtes 1500 bis 6000 und erreichten damit starke Agglutinationen über große Flächen des Plasmalemmas und eine hohe Anzahl fusionierter Protoplasten.

Für eine erfolgreiche Kultur fusionierter Protoplasten ist es von grundlegender Bedeutung, daß ihre Vitalität durch die Fusionsbehandlung nicht beeinflußt wird. Dieser Punkt ist bisher noch nicht genügend beachtet worden. Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit stand daher unter dem Aspekt, für die verwendeten Protoplasten aus Zellkulturen von Atropa belladonna, Daucus carota und aus Mesophyll von Petunia hybrida und Nicotiana tabacum Bedingungen zu ermitteln, unter denen eine hohe Anzahl möglichst nicht geschädigter, fusionierter Protoplasten erzielt und kultiviert werden kann.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Zellkulturen und Pflanzen

2.1.1. Daucus carota

Die in den Versuchen verwendeten Zellkulturen von Daucus carota (cv. Rote Riesen) wurden auf 0.8% Agarmedium nach Murashige und Skoog (1962) in der Modifikation von Reinert (1966) mit $5 \cdot 10^{-8}$ g/ml 2,4D (2,4- Dichlorphenoxyessigsäure) kultiviert. ("MS- Medium"). Nach längerer Subkultur konnten die Kalluszellen in flüssiges Medium der gleichen Zusammensetzung überführt und als Sus pensionskultur gehalten werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kulturen waren Zellsuspensionen eines anthocyanhaltigen Stammes, der bei den beschriebenen Versuchen ein Alter von 6 Jahren erreicht hatte und keine morphogenetische Aktivität mehr zeigte. Für einige Versuche wurden anthocyanfreie Zellen eines 1.5 Jahre alten Stammes eingesetzt, der zur Bildung von Embryonen befähigt war. Die Zellkulturen wurden im Dunkeln bei 25°C $\pm$1°C auf Schüttelmaschinen bei 80 rpm. kultiviert. Die Subkultur erfolgte in einem 7 tägigen Übertragungsrythmus. Dazu wurden jeweils 5 ml der Suspension in 30 ml frisches Medium übertragen. Die Isolierung der Protoplasten erfolgte in der exponentiellen Phase der Kultur am 2. -4. Tag der Übertragungsperiode.

2.1.2. Atropa belladonna

Die Kallusbildung war an Stengelstücken von Atropa belladonna (cv. lutea Döll) auf Agarmedium nach Wood und Braun (1961) mit 2 mg/l NAA (Naphthylessigsäure) und 0.5 mg/l Kinetin induziert worden. Der Kallus konnte nach mehrmaliger Subkultur in flüssiges Medium der gleichen Zusammensetzung übertragen werden. Die Atropazellkultur war bei den hier beschriebenen Versuchen 2 Jahre alt. Embryogenese konnte durch Entzug des Auxins induziert werden. Die Kulturbedingungen entsprachen denen für Karottenkulturen genannten Bedingungen.

2.1.3. Nicotiana tabacum

Diploide Tabakpflanzen wurden nach der Keimung der Samen von Nicotiana tabacum var. Badischer Burley in Klimakammern bei 22000 lux, 24°C und 70 % relativer Feuchtigkeit aufgezogen. Zur Isolierung von Protoplasten dienten die voll entfalteten Blätter der oberen Pflanzenregion 50-70 Tage alter Pflanzen.

Haploide Tabakpflanzen wurden über Antherenkultur der o.g. Varietät gezogen. Die in vitro gekeimten Pflänzchen konnten nach ausreichender Wurzelbildung (etwa 10 Wochen nach der Inokulation der Antheren) getopft, und unter den für diploiden Tabak beschriebenen Bedingungen aufgezogen werden. Als Material für die Protoplastenisolierung verwendete man die oberen voll entfalteten Blätter 50 - 70 Tage alter Pflanzen. (Zeit nach dem Topfen)

2.1.4. Petunia hybrida

Die Aufzucht der Petunia hybrida var. satellite Pflanzen entsprach der für diploiden Tabak beschriebenen Weise. Zur Zeit der Protoplastenisolierung waren die Pflanzen 30 - 50 Tage alt.

2.2. Medien und Kulturbedingungen

2.2.1. Enzyme und Plasmolytika

Für die enzymatische Isolierung von Protoplasten wurden Pektinasen und Cellulasen benutzt. Als Pektinasen standen Macerozym der Firma All Japan Biochemicals Co. und Macerozym R10 der Firma Kinki Yakult MFG. Co. Japan aus Rhizopus spec. zur Verfügung. Das zu Beginn der Arbeit hauptsächlich für die Isolierung von Karottenprotoplasten verwendete Macerozym wurde später völlig gegen das bedeutend reinere Präparat Macerozym R10 ersetzt. Dieses Enzym zeichnete sich außerdem noch durch bedeutend größere Aktivität aus. Die zu verwendende Enzymmenge konnte daher auf ein Zehntel reduziert werden.

Als Cellulasen wurden Cellulase Onozuka SS (All Japan Biochemicals) und Cellulase Onozuka R10 (Kinki Yakult) benutzt. Diese Cellulasen waren aus Trichoderma viride gewonnen worden. Cellulase R10 hatte gegenüber der SS Cellulase eine zehnfach höhere Aktivität. Die Cellulase SS wurde nur zu Beginn der Arbeit eingesetzt, und um Schädigungen der Protoplasten durch die Verunreinigungen des Enzyms mit Ribonukleasen und Proteasen u.a. zu vermeiden, wurde das SS Enzym einer speziellen Behandlung unterworfen. Dazu wurden 15 g des Enzyms in 0.5M Kochsalzlösung suspendiert, für 2 - 3 Stunden gerührt und über Nacht bei 4°C aufbewahrt Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der klare Überstand auf einer Biogel P6 Säule (4 cm ø, Länge 40 cm) entsalzt. Die Eluierung erfolgte mit destilliertem Wasser. Das Eluat wurde anschließend lyophilisiert. Bei Verwendung von Cellulase R10 war eine solche Reinigung nicht erforderlich, da dieses ein sehr reines, hochaktives Enzympräparat ist.
Als Plasmolytika wurden Sorbit und Mannit in P.A. Qualität (Merck) eingesetzt.
In den Hauptversuchen wurden Protoplasten aus Zellkulturen mit 1.5% Cellulase R10, 0.5% Macerozym R10 und 0.6M Sorbit in MS- Medium isoliert. Die Mesophyllprotoplasten wurden hauptsächlich mit einer Enzymmischung von 0.5% Cellulase R10, 0.1% Macerozym R10 und 0.7M Mannit in einer Salzlösung (CPW-Lösung)(Cocking und Peberdy 1974) isoliert.

2.2.2. Kulturmedien

Die Kultur der Protoplasten erfolgte entweder als Suspension in flüssigem Nährmedium oder in 0.6% igem Agarmedium. Weiterhin bestand die Möglichkeit, die Protoplasten in Mikrotropfen auf Deckgläsern in Plastikpeterischalen (Falcon) zu kultivieren (Kao und Michayluk 1974).
Die verwendeten Nährmeden waren MS- Medium (Reinert 1966), Nagata Takebe (TP- Medium) (1971), B5- Medium (Gamborg 1968) und Modifizierungen von diesen, jeweils mit entsprechenden Plasmolytika als Zusatz.

2.2.3. Fusionen

In den Hauptversuchen wurden die Protoplasten mit Polyäthylenglykol (PEG) des Molekulargewichtes 1500 der Firma Merck fusioniert. Die verwendete PEG Lösung enthielt neben 45% PEG 10.5 mM $CaCl_2$ und 0.7 mM KH_2PO_4. Die Behandlung wurde nach der von Kao et al.(1974) beschriebenen Methode durchgeführt. Daneben kamen die von Power et al. (1970) beschriebenen Fusionsmethoden mit $NaNO_3$ Lösung, sowie die von Keller und Melchers (1973) entwickelte Methode mit einer bei pH 10.5 gepufferten $CaCl_2$ Lösung zur Anwendung.

2.2.4. Sterilisation

Die Kulturmedien wurden, sofern keine hitzeempfindlichen Substanzen wie Aminosäuren, Proteinhydrolysat (Edamin) oder verschiedene Vitamine enthalten waren, durch Autoklavieren bei 120°C und 1 atü. sterilisiert. Alle hitzeempfindlichen Lösungen, sowie die Enzym- und Fusionslösungen wurden mit Hilfe eines Sartorius Filtrationsgerätes (SM 16510) mit 0.2 bis 0.45 µ Celluloseacetatmembranfiltern sterilfiltriert.

2.2.5. Kulturbedingungen

Die Kultur der Protoplasten aus Zellkulturen erfolgte im Dunkeln bei 28°C. Mesophyllprotoplasten allein, als auch die durch Fusionsversuche erhaltenen Mischungen von Protoplasten aus Zellkulturen und Mesophyllgewebe mit den entsprechenden Homo- und Heterokaryonten wurden zunächst für 16 Stunden im Dunkeln, dann für 48 Stunden bei 500 lux gehalten. Die Dauerkultur erfolgte anschließend bei 2300 lux im 16 zu 8 Stunden Hell- Dunkelrythmus und 25°C.

2.3. Mikroskopische Untersuchungen

Für Untersuchungen im Hellfeld stand das Ortholux Mikroskop der Firma Leitz mit Plan- Apochromatischen Objektiven zur Verfügung. Mit dem Umkehrmikroskop (Chemikermikroskop) der Firma Leitz konnten Suspensionskulturen und Zellkulturen direkt beobachtet werden.
Für Zellwanduntersuchungen und einige Kernfärbemethoden waren

fluoreszensmikroskopische Untersuchungen erforderlich. Es wurde das Auflichtverfahren mit 250 W Hg Lampe und einer Filterkombination (Erregerfilter 4mm BG 38, 3mm BG3 und Sperrfilter K 510) durchgeführt.

2.4. Photographie

Zur mikrophotographischen Abbildung der Protoplasten und Zellen diente sowohl der Orthomat der Firma Leitz, der auf dem Ortholux Mikroskop aufgesetz war, als auch eine Filmträgerkassette mit Pronto-Pressansatz für Aufnahmen am Umkehrmikroskop. Für makroskopische Abbildungen stand eine Ashai Pentax K2 Kamera mit Makroobjektiv zur Verfügung. Als Filmmaterial wurden der Agfa Ortho 25 Professional und der Agfa Pan 25 Professional Film der Firma Agfa Gaevert, für Farbabbildungen der Kodachrome II Film der Firma Kodak verwendet.

2.5. Fixierungen und Färbungen

Die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen erfolgte mit einer 0.0 1% igen Evans Blau Lösung.
Für Vitalfluorochromierungen wurde eine 0.0 2% ige Acridinorangelösung verwendet.
Die Fixierung von Zellen erfolgte im Gemisch nach Carnoy. Protoplasten wurden durch 4% Formaldehyd in 10% iger Mannitlösung (Miller 1971) fixiert. Kernfärbungen wurden nach Feulgen, mit Carbol Fuchsin (Carr und Walker 1961) nach der Methode von Keller et al. (1973) und mit 2% iger Orceinlösung in 45%iger Propionsäure durchgeführt.

2.6. Zählungen und Auswertungen

Die Auszählung von Zellen und Protoplasten erfolgte in einem Fuchs Rosenthal Hämocytometer. Pro Bewertungseinheit wurden mindestens 300 bis 1000 Zellen bzw. Protoplasten ausgezählt. Für die Ermittlung der Plattierungseffizienz (Plating Efficiency) der Protoplasten in Agarmedium wurden in wahllos markierten Bereichen der Petrischalen der Prozentsatz sich teilender Zellen bestimmt.
Die Signifikanz einiger Ergebnisse wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat Testes bestimmt. (Cavalli- Sforza).

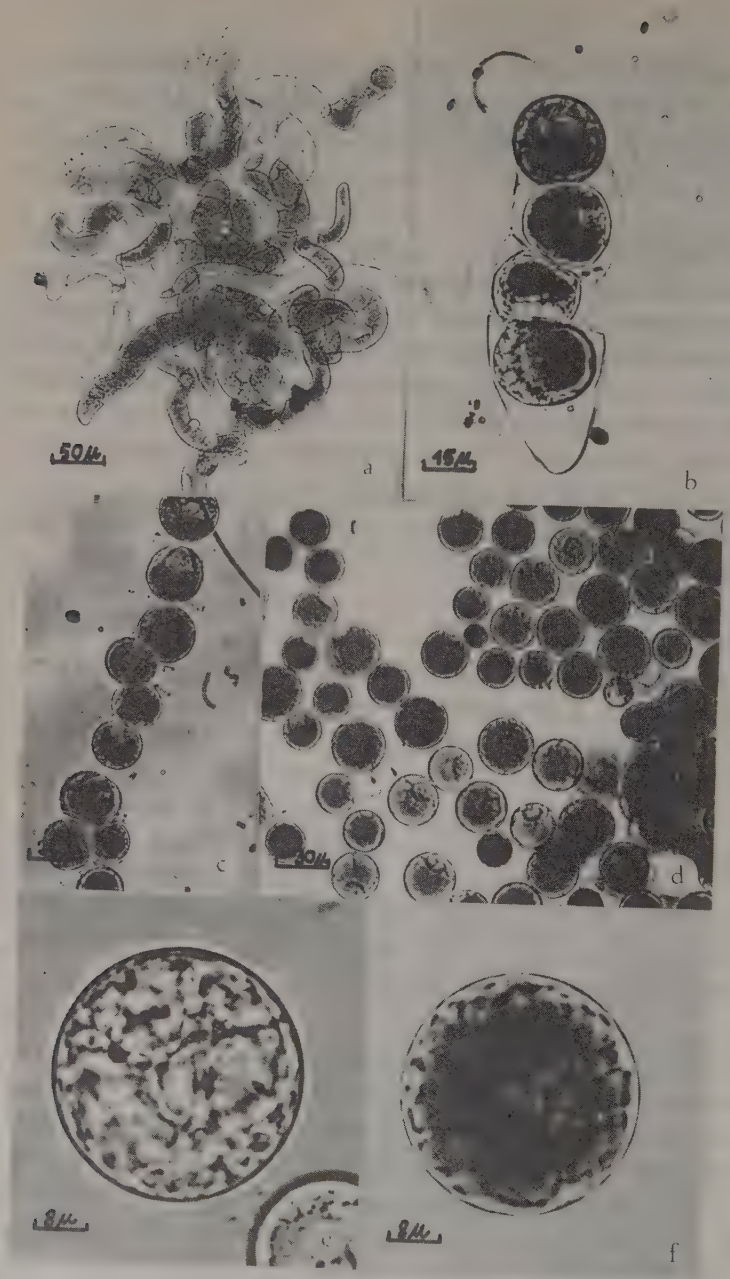


Abb.1a-f: Isolierung von Protoplasten aus Zellsuspensionen von Daucus carota. a) anthocyanhaltige Zellen b) plasmolysierte Zellen, 15 Minuten nach der Übertragung in Enzymlösung mit 0.6M Sorbit. c) Nahezu vollständige Auflösung der Zellwand. d) frisch isolierte Protoplasten, e)und f) Protoplasten mit unterschiedlichem Anthocyangehalt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Isolierung und Kultur von Protoplasten verschiedener Species

Die Isolierung von Protoplasten verursacht eine abrupte Veränderung der Lebensbedingungen der Zelle. Es ist daher erforderlich, Isolierungsbedingungen zu ermitteln, durch die keine irreversiblen Schäden hervorgerufen werden, sondern welche es ermöglichen, viele lebensfähige Protoplasten zu erhalten, die in der Lage sind, Zellwände zu regenerieren und sich zu teilen. Die wesentlichsten Faktoren, wie Art und Konzentration der Enzyme und des Plasmolytikums als auch Temperatur und Zeit des Isolierungsprozesses sind daher überprüft worden.

3.1.1. Daucus carota

Isolierung

Karottenprotoplasten wurden 2 - 4 Tage nach der wöchentlichen Übertragung der anthocyanhaltigen Zellkultur (Abb. 1 a) isoliert. Die Endkonzentration der Enzyme und des Plasmolytikums betrug nach dem Mischen gleicher Teile Zellsuspension und Enzymlösung 1.5% Cellulase, 0.5% Macerozym und 0.6M Sorbit. Dieses Verfahren erwies sich als vorteilhafter als die Methode, die Zellen abzufiltrieren und das Zellmaterial (200mg) in 10ml Enzymlösung zu übertragen. Durch langsame Zugabe des Enzyms konnte ein osmotischer Schock weitgehend verhindert werden. Wie bei Reinert u. Hellmann (1973) erwies sich auch hier eine Sorbitkonzentration von 0.6M als optimal. Diese hypertonische Lösung bewirkte eine vollständige Plasmolyse der Zellen (Abb. 1 b) und das Enzym konnte die Zellwandauflösung von außen und innen bewirken (Abb. 1 c). Durch eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Cellulasekonzentrationen von 0.5 bis 3% gereinigter SS bzw. R10 Cellulase Onozuka wurde ermittelt, daß mit 1- 1.5% Cellulase die größte Anzahl lebensfähiger Protopalsten isoliert werden konnte (Abb. 1 d, e, f).

Einen beachtlichen Einfluß auf die zur Isolierung von Protoplasten benötigte Zeit hatte die Temperatur. (Tab. 1). Bei einer Behandlung bei 30 - 33°C konnten Protoplasten innerhalb kurzer Zeit isoliert werden (4 - 5 Stunden). Da sie durch die relativ hohe Temperatur offensichtlich nicht geschädigt waren, konnte dieser Bereich als optimal angesehen werden.

Temperatur	Zeit
20°C	10 Std.
25°C	7 Std.
30°C	5 Std.
33°C	4 Std.

Tabelle 1: Einfluß der Temperatur auf die zur Isolierung von 90% Karottenprotoplasten benötigte Zeit.

Nach Beendigung der Enzymbehandlung war es erforderlich, die Protoplasten von eventuell noch vorhandenen Zellen und Verunreinigungen zu trennen und von dem Enzym freizuwaschen. Protoplasten reagieren auf mechanische und osmotische Beanspruchung sehr viel empfindlicher als Zellen und erfodern daher eine vorsichtige Behandlung.
Eine saubere Trennung der Protoplasten von Zellen und Verunreinigungen konnte durch Zentrifugation der Suspension auf einem Ficollgradienten erzielt werden. Der Gradient bestand aus zwei Stufen, die in 7% iger Sorbitlösung 6% bzw. 9% Ficoll enthielten. Die Protoplastensuspension wurde vorsichtig auf den Gradienten geschichtet und dieser bei 100 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Zellen und Verunreinigungen setzten sich am Boden des Röhrchens ab, während die intakten Protoplasten sich auf den Ficollschichten ansammelten. Zur vollständigen Entfernung der Enzymlösung war es möglich, mit 20 - 30 ml Medium die Protoplasten auf einem 0.45 µ Filter (Sartorius) zu waschen. Der Filter wurde dabei mit einem Vorfilter gepolstert, so daß ein Zerplatzen der Protoplasten durch Anhaften an den Filter vermieden werden konnte. Einfacher war es jedoch, die Protoplasten durch dreimaliges Pelletieren und Resuspendieren in frischem Medium zu waschen, wobei sich die Protoplasten bei der Zentrifugation mit 100 x g als stabil erwiesen.

Kultur

Generell bildeten isolierte Protoplasten von Daucus carota in MS-, B5- und TP-Medium nach 2 -3 Kulturtagen Zellwände. (Abb. 2a und b). Diese ließen sich durch Plasmolyse oder fluoreszensmikroskopisch nach Färbung mit Cacofluor White nachweisen. Nach 3 Tagen konnten erste Teilungen beobachtet werden (Abb.2c), und innerhalb der ersten Kulturwoche teilten sich einige Zellen zum 2. und 3. Mal, so daß kleine Kolonien gebildet wurden (Abb. 2d,e und f). Innerhalb von 20 Kulturtagen wuchsen die Kolonien zu kleinen Kalli aus (Abb. 2g) und wurden makroskopisch sichtbar.(Abb. 4 und 5 a,b).Nach 28 tägiger Kulturzeit war kein weiteres Wachstum mehr zu beobachten. Wurden dann kleine Stücke des Agars mit den regenerierten Kolonien auf Medium mit geringerer Sorbitkonzentration übertragen (0.2M) (Abb.5b), so wurde das Wachstum verstärkt fortgesetzt, und es bildeten sich Kallusmassen. Die regenerierten Kalli von Protoplasten aus embryogenen, bis zu 2.5 Jahre alten Karottenstämmen bildeten nach der Übertragung auf auxinfreies Medium Embryonen. Es konnten die typischen Stadien, Herz- und Torpedoformen beobachtet werden (Abb. 5c und d), welche auf Agarmedium zu ganzen Pflanzen aufgezogen werden konnten.(Abb. 5e).

In den folgenden Versuchen wurde der Einfluß von Temperatur, Molarität und Zusammensetzung des Kulturmediums auf die Teilungsaktivität von Karottenprotoplasten bestimmt.

Temperatur

Die anthocyanhaltigen, isolierten Karottenprotoplasten wurden mit einer Dichte von 10^5 Protoplasten /ml Medium in MS Agarmedium(0.6%) und 0.425M Sorbit plattiert und im Dunkeln bei 18°C, 20°C, 22°C, 25°C, 28°C und 30°C kultiviert.Die Teilungsaktivität der Protoplasten war bei den niedrigen Temperaturen deutlich geringer; erst ab 25°C war ein gutes Wachstum zu beobachten. Als optimale Kulturtemperatur wurde 28°C ermittelt, obwohl zunächst die größte Teilungsaktivität bei 30°C beobachtet wurde. Jedoch färbten sich hier die Kolonien braun und starben nach 4 wöchiger Kulturzeit vollständig ab.

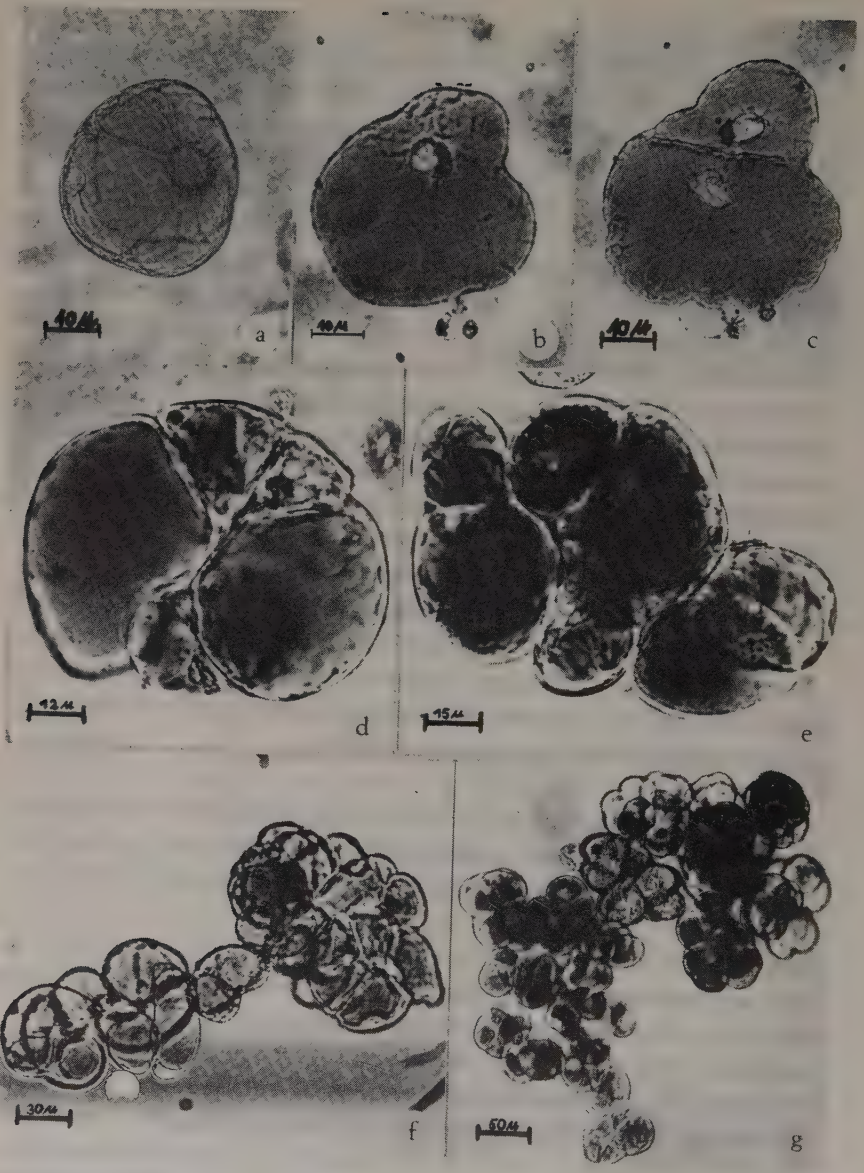


Abb. 2: Kultur von Karottenprotoplasten. a) Zellwandregeneration 48 Stunden nach der Protoplastenisolierung. b und c): Protoplast auf MS Agarmedium, Zellwandregeneration nach 2 Kulturtagen, (b), darauffolgende Kernteilung und Ausbildung des Phragmoplasten nach 3 Kulturtagen (c). d und e): Aus Karottenprotoplasten nach 7 Tagen regenerierte Zellkolonien. f und g): Fortgesetztes Teilungswachstum der Kolonien bis zur Bildung kleiner Kalli (g).

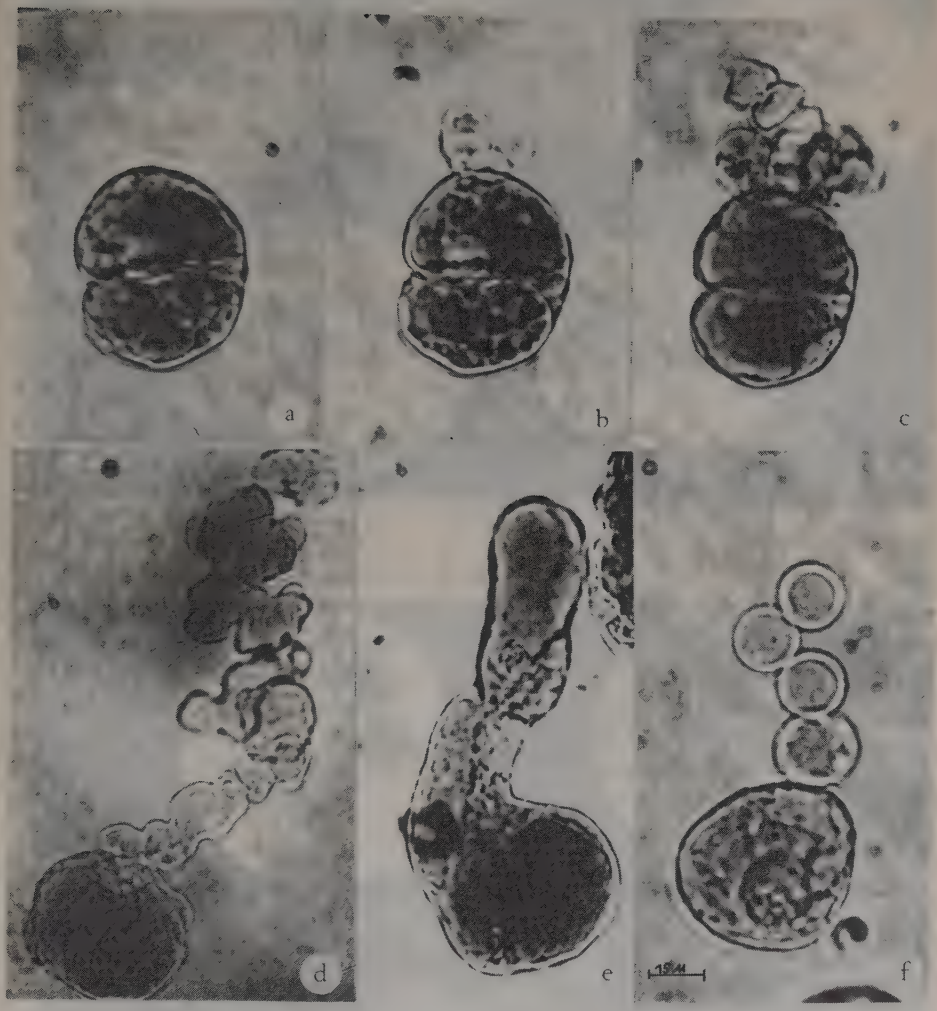


Abb. 3: Budding und Ausbildung von Subprotoplasten bei der Kultur von Karottenprotoplasten auf MS Agarmedium. a-c) Verschiedene Stadien fortgesetzten Buddings innerhalb des 3. und 5. Kulturtages der Karottenprotoplasten. d) Entwicklung nach 10 Kulturtagen. e) Buddingähnliche Verformung eines Protoplasten. f) Bildung von Subprotoplasten nach 4 Kulturtagen.

Abb. 4

Abb. 5

Tabelle 2: Effekt verschiedener Zucker und Medien auf die Zellwandregeneration und Koloniebildung von Protoplasten aus Zellkulturen von Daucus carota.(Angaben in Prozent 500 gezählter Protoplasten und Zellen.)

Medium	Tage	tote Protopl.	lebende Protopl.	Zellen	geteilte Zellen	Kolonien 3-10 Zellen
B5						
Glukose 0.65 M	7	41	21	23	13	2
Sorbit 0.51 M	14	42	18	14	18	8
B5						
Sacchar. 0.029M	7	42	23	22	9	4
Sorbit 0.51 M	14	43	20	15	13	9
MS						
Glukose 0.1 M	7	24	16	44	14	2
Sorbit 0.425M	14	28	12	32	19	9
MS						
Sacchar. 0.058M	7	20	11	48	16	5
Sorbit 0.425M	14	22	9	37	20	12

Abb.4: Teilungsaktivität von Karottenprotoplasten in Abhängigkeit der Plasmolytikumskonzentration des Kulturmediums. (MS Medium mit 0.3 bis 0.6M Sorbit)

Abb. 5: Kallusbildung, Embryogenese und Pflanzenregeneration aus Protoplasten von Daucus carota. a) Kallusbildung 28 Tage nach der Isolierung der Protoplasten. b) Agarstücke mit Kolonien,welche auf frisches MS Medium mit 0.2M Sorbit übertragen wurden. c) Herzförmige Embryonen 10 Tage nach der Übertragung aus Protoplasten regenerierter Zellen auf Medium ohne Auxin. d) Torpedostadium, e) Regenerietes Pflänzchen, 14 Wochen nach der Isolierung der Protoplasten.

Molarität des Kulturmediums

Karottenprotoplasten wurden in Enzymlösung mit 0.6M Sorbit isoliert und in MS-Agarmedium mit Sorbitkonzentrationen von 0.3 bis 0.7M kultiviert. Um einen Deplasmolyse-Schock zu verhindern, wurden die niedrigen Sorbitkonzentrationen durch stufenweises Waschen in 0.5, 0.4 und zuletzt 0.3M Sorbitlösung erreicht. Die Protoplasten wurden in einer Dichte von 10^5 Protoplasten/ ml Medium plattiert und bei 28°C kultiviert. In 0.7M Medium war die Teilungsaktivität der Protoplasten sehr stark reduziert, so daß auch nur vereinzelt kleine Kalli gebildet wurden. In 0.6M Medium zeigten die Protoplasten schon ein stärkeres Wachstum, und bei weiterer Erniedrigung bis zu 0.4M Medium nahm die Teilungsaktivität und damit die Kallusbildung zu.(Abb. 4). Im 0.3M Medium wurde jedoch Zerplatzen und starkes "Budding" der Protoplasten beobachtet, (Abb.3 a-f) so daß letztlich eine geringere Anzahl regenerierter Kolonien ermittelt wurde.

Zusammensetzung des Kulturmediums

Karottenprotoplasten wurden unter den oben beschriebenen Bedingungen in flüssigem B5 Medium und MS Agarmedium mit 0.425M bzw. 0.51M Sorbit als Osmotikum und Saccharose und Glukose als Kohlenhydrate kultiviert. (Tab.2). Die Protoplasten reagierten unterschiedlich auf die verschiedenen Medien. In MS Agarmedium regenerierten innerhalb der ersten Kulturwoche 85% der Protoplasten Zellwände, in B5 Medium dagegen nur 60-64%.Die Lebensfähigkeit der Protoplasten war in B5 und MS Medium ebenfalls unterschiedlich. Es wurden 42% toter Protoplasten in B5-, dagegen nur 24% in MS- Medium ermittelt. Nach 14 tägiger Kulturzeit hatten sich die Protoplasten an das B5 Medium gewöhnt und zeigten die gleiche Anzahl mindestens einmal geteilter Zellen (40% der lebenden Zellen). Die Verwendung von Glukose oder Saccharose im Kulturmedium hatte kein unterschiedliches Verhalten der Protoplasten zur Folge.

3.1.2. Atropa belladonna

Die mit Karottenprotoplasten gewonnenen Erfahrungen konnten auf ein bezüglich der Isolierung und Kultur von Protoplasten völlig neues Material angewendet werden. Es wurden Versuche durchgeführt, um Protoplasten aus Zellkulturen von Atropa belladonna cv. lutea Döll zu isolieren und kultivieren.

Isolierung

Der physiologische Zustand des Ausgangsmaterials hat einen großen Einfluß auf den Erfolg der Protoplastenisolierung. Zellkulturen mit überwiegend großen,stark vakuolisierten Zellen ergaben geringe Protoplastenausbeuten. Daher war es zunächst erforderlich,eine Kultur mit kleinen, dünnwandigen teilungsaktiven Zellen zu erhalten. Dieses konnte durch wöchentliches Übertragen von 5 ml der Zellsuspension in 30 ml frisches Medium erzielt werden. Diese Übertragungsweise bewirkte eine gewisse Konditionierung des Kulturmediums, was das Wachstum der Zellen positiv beeinflußte. (Abb.6a). Atropa-Zellkulturen 3-4 Tage nach der Übertragung erwiesen sich als Material für die Isolierung von Protoplasten optimal.

Isolierungsversuche mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen von 0.5- 3% Cellulase Onozuka R10 und 0.1- 1.5% Macerozym R10 ergaben, daß wie auch bei der Isolierung von Protoplasten aus Daucus carota Zellkulturen die besten Ergebnisse mit 1.5% Cellulase und 0.5% Macerozym zu erzielen waren. Niedrigere Konzentrationen führten zu unvollständig gelösten Zellwänden, welche die Protoplasten als Schleier umgaben. Mit höheren Konzentrationen (1.5% Macerozym, 3% Cellulase) konnten keine höheren Protoplastenausbeuten erzielt werden.Durchschnittlich wurden 90% der Suspensionzellen zu Protoplasten isoliert. Bestanden die Zellkulturen auf Grund starker Teilungsaktivität aus sehr dichten Kolonien, war es nützlich, das Enzym nach der Hälfte der Isolierungszeit gegen frisches Enzym auszutauschen. So war es möglich Atropa Protoplasten innerhalb von 4 Stunden zu isolieren. (Abb. 6b)

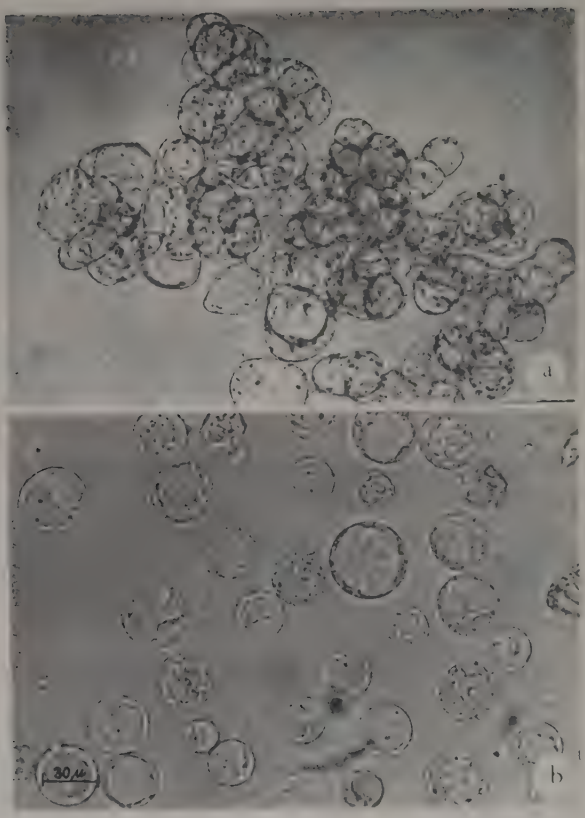


Abb. 6 : Zellen und Protoplasten von Atropa belladonna. a) Sich aktiv teilende Zellen einer Atropa- Suspensionskultur. b) Aus Zellkulturen von Atropa belladonna isolierte Protoplasten.

Die Ermittlung einer optimalen Isolierungstemperatur für Atropa-Protoplasten bestätigte das bei der Isolierung von Karotten-Protoplasten erhaltene Ergebnis. In einem Schüttelwasserbad (60rpm) von 30°C konnten innerhalb von 4 Stunden aus 90% der vorhandenen Zellen Protoplasten freigesetzt werden.
Der bei der Reinigung von Karottenprotoplasten verwendete Zweistufen-Ficollgradient konnte für Atropa-Protoplasten nicht benutzt werden, da damit keine eindeutige Trennung von Verunreinigungen erzielt wurde. Dagegen erwies sich eine Filtration durch ein Netz mit einer Maschenweite von 40 µ und anschließender Zentrifugation (100g) in 15% iger Saccharoselösung als sehr effektiv. Die intakten Protoplasten schwammen an die Oberfläche der Saccharoselösung, während sich Zellen und Protoplasten mit eventuell vorhandenen Zellwandresten am Boden des Zentrifugenglases absetzten, bzw. innerhalb der Saccharoselösung schwammen. Bevor die Protoplasten zur Kultur in flüssiges oder festes Medium eingebracht wurden, war es erforderlich, sie durch dreimaliges Zentrifugieren mit Kulturmedium von der Enzym- und Saccharoselösung freizuwaschen.

Kultur

Enzymatisch isolierte Atropa-Protoplasten (Abb 7a) konnten in MS-, B5- und TP Medium erfolgreich kultiviert werden. Diesen Medien war 2 mg/l NAA und 0.1 mg/l Kinetin zugesetzt worden. Es erwies sich als vorteilhaft, die Protoplasten zunächst für 5 -7 Tage in flüssigem Medium zu kultivieren, und sie dann in einer dünnen Schicht über Agar der gleichen Zusammensetzung zu plattieren. Während der ersten 2 Tage nach der Isolierung regenerierten die Protoplasten Zellwände(Abb7b). Die Zellen teilten sich nach 2-3 Kulturtagen zum ersten Mal. Es konnten äquale (Abb. 7d und e) und inäquale Teilungsformen (Abb. 7c) beobachtet werden. Einige Zellen teilten sich während der ersten Kulturwoche auch 2 oder 3 mal, so daß mehrzellige Kolonien gebildet wurden. (Abb. 7 f und g). Nach dem Ausstreichen der Protoplastenkultur auf dem Agarmedium setzten die Zellen das Wachstum verstärkt fort und bildeten innerhalb von 2- 3 Wochen 20 bis 30 zellige Kolo-

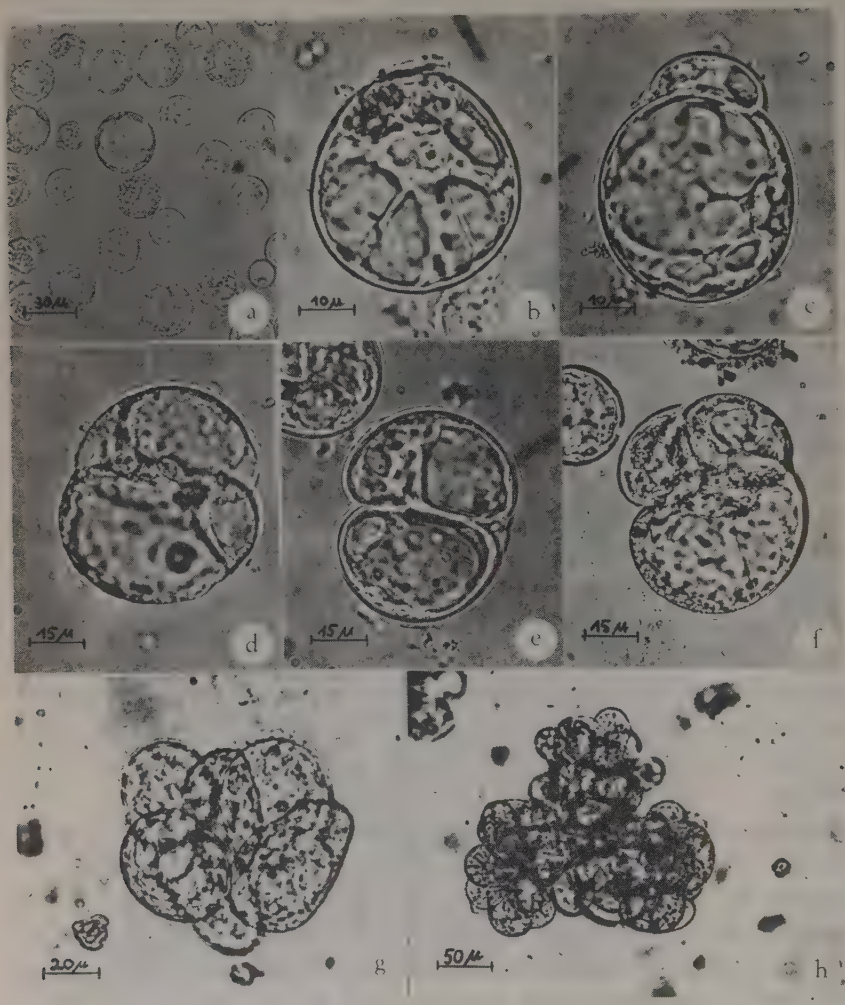


Abb. 7 : Isolierung und Kultur von Protoplasten aus Zellkulturen von Atropa belladonna. a) Frisch isolierte Protoplasten nach 4 stündiger Behandlung mit 1.5% Cellulase R10 und 0.5% Macerozym R 10. b) Zellwandregeneration eines Protoplasten nach 48 stündiger Kultur in flüssigem Medium. c bis f) Teilungen der Protoplasten innerhalb von 6 Kulturtagen. g) mehrzellige Kolonie,die nach Übertragung der Protoplastensuspension auf Agarmedium erhalten wurde. h) Fortgesetzte Teilungen der aus Protoplasten regenerierten Atropazellen bis zur Bildung von Kallus innerhalb 28 Kulturtagen.

nien. (Abb. 7 h). Medium mit geringerer Sorbitkonzentration (0.2M) stimulierte die Teilungsaktivität der Zellen, so daß Kallus gebildet wurde. Die Übertragung der Kalli auf flüssiges, NAA-freies Medium ,induzierte Embryogenese in vitro.(Abb. 8 a - c). Nach 14 tägiger Kulturzeit konnten herz- und torpedoförmige Stadien beobachtet werden. Aus diesen war es möglich, auf Agar-Medium intakte Pflanzen aufzuziehen (Abb. 8 d und e), die nach ausreichender Wurzelbildung getopft wurden. (Abb. 8 g)

Einfluß der Protoplastendichte auf die Teilungsaktivität

Atropa Protoplasten wurden mit unterschiedlicher Dichte im Kulturmedium (MS mit 2 mg/l NAA und 0.1 mg/l Kinetin) suspendiert und bei 28°C im Dunkeln kultiviert. Dichten zwischen 6.10^4 und 1.10^5 Protoplasten / ml Medium wurden als optimal ermittelt (Tab. 3). Nach 7 Kulturtagen hatten sich 16% der Protoplasten mindestens einmal geteilt. Durch Übertragung der Kultur auf Agarmedium konnte der Prozentsatz geteilter Zellen nach insgesamt 14 Tagen auf 56% gesteigert werden. (Tab.4)

Tabelle 3:
Effekt der Protoplastendichte auf die Zellwandregenerations- und Teilungsfähigkeit der Atropa belladonna Protoplasten nach 7 Kulturtagen.

Protopl Dichte	Tote Protopl.	lebende Protopl.	Zellen	geteilte Zellen	Kolonien 3-10 Zellen
3.10^4	61.6	13.3	20	5	-
6.10^4	44.1	4.9	31	16	4
1.10^5	43.0	6.4	34.6	12.9	3
2.10^5	51.3	7.1	26.6	11	3.3

Angaben in Prozent 500 gezählter Protoplasten und Zellen.

Abb. 8 : Verschiedene Stadien der Embryogenese und Regeneration von Pflanzen bei der Kultur isolierter Protoplasten von Atropa belladonna. a) Frühes Stadium der Embryogenese, 5 Tage nach der Übertragung von Kallus in auxinfreies Medium. b) Torpedoförmiger Embryo, 14 Tage nach der Übertragung in das Differenzierungsmedium. Der Embryo zeigt gleichzeitig die Ausbildung einer Wurzel. c) Torpedoförmiger Embryo. d und e) Regeneration von Pflänzchen 10 und 12 Wochen nach der Isolierung der Protoplasten. f) Fortgesetztes Wachstum des Pflänzchens auf Aparrsdium. g) Normale Entwicklung eines aus Protoplasten regenerierten Atropapflänzchens nach dem Topfen.

Tabelle 4: Prozentsatz geteilter Zellen 14 Tage nach der Isolierung von Atropa belladonna-Protoplasten.

Protoplasten-Dichte	geteilte Zellen
$5.\ 10^4$	52.9 %
$1.\ 10^5$	56 %
$1.2.10^5$	51 %
$2.\ 10^5$	46.6 %

Auxinkonzentration des Kulturmediums

Der zuvor beschriebene Versuch hatte gezeigt, daß ein relativ großer Anteil der isolierten Atropa-Protoplasten nicht lebensfähig war. Die Vermutung, daß die Auxinkonzentration (2 mg/l) eventuell zu hoch warund das Absterben bzw. Platzen der Protoplasten bewirkt haben könne, wurde durch eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen NAA Konzentrationen im Kulturmedium nicht bestätigt. Tabelle 5 zeigt, daß alle verwendeten NAA Konzentrationen nach 7 tägiger Kulturzeit durchschnittlich zur Bildung 44% toter Protoplasten geführt hatten.

Tabelle 5: Effekt des Auxingehaltes des Kulturmediums auf das Verhalten von Atropa belladonna Protoplasten während einer Kulturzeit von 14 Tagen.

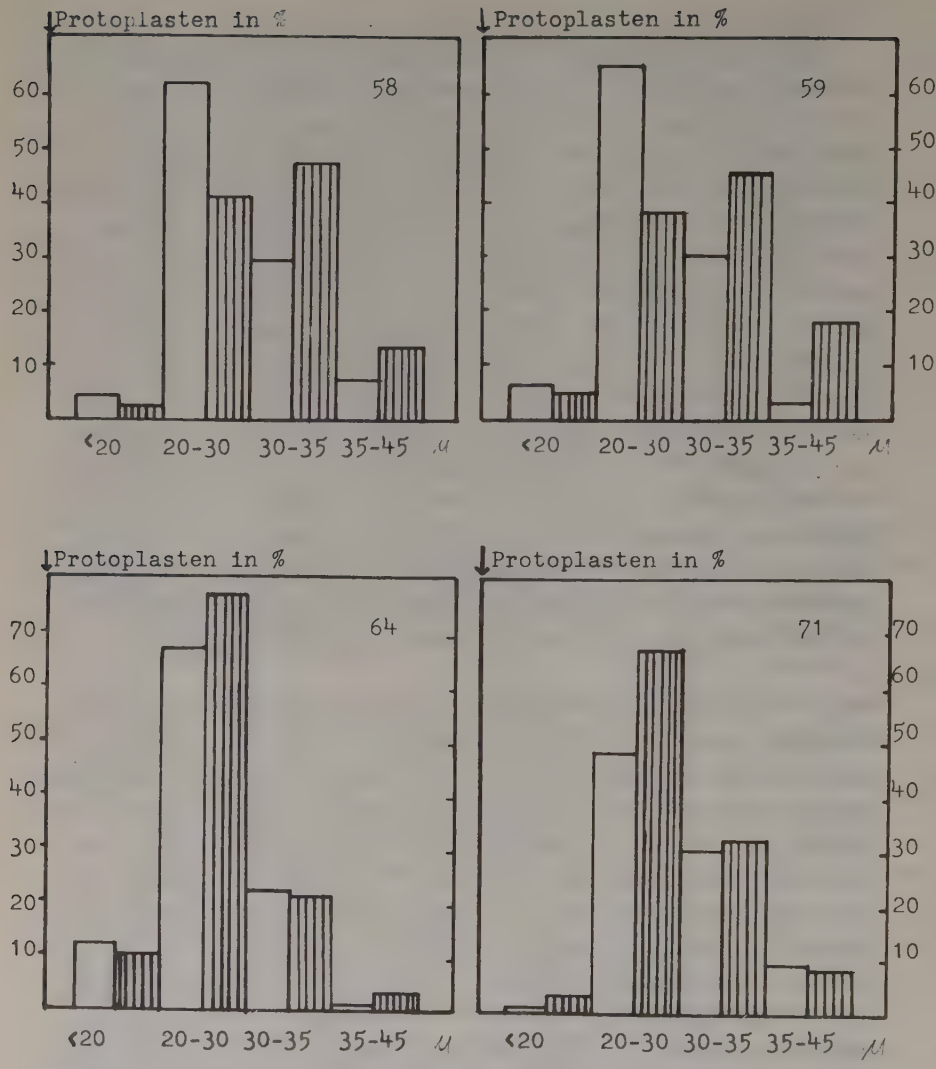
NAA mg/l	Tage	tote Protopl.	Protopl.	Zellen	geteilte Zellen	Kolonien 3-10 Zellen
0.2	7	47	7.9	29.o	9.o	2.3
	14	58	2.3	17.5	10	12
0.8	7	44.3	8.0	30.5	10	5.9
	14	61	0.8	19.4	9.3	11
2.0	7	43.6	7.3	27.3	14	6.7
	14	58	3	17	10	12

3. 1.3. Mesophyllprotoplasten von Nicotiana tabacum und Petunia hybrida

Die Isolierung von Protoplasten aus Blättern erfordert eine spezielle Vorbehandlung des Materials. Da die Pflanzen nicht unter völlig sterilen Bedingungen aufgezogen werden können, war es notwendig, die zu verwendenden Blätter vor der Enzyminkubation zu sterilisieren. Kurzes Eintauchen in 70% igen Alkohol und eine nachfolgende 15 minütige Behandlung mit Natriumhypochloridlösung (ACE 6 %) erwies sich als geeignet, keimfreies Blattmaterial zu erhalten. Um eine Schädigung der Blätter durch die Hypochloridlösung zu vermeiden, wurden sie dreimal sorgfältig mit sterilisiertem Wasser gewaschen.
Für die Isolierung möglichst großer Mengen intakter Mesophyllprotoplasten mußte die untere Epidermis der Blätter abgezogen werden. Versuche, Protoplasten aus Blättern mit völlig intakter Epidermis zu isolieren, ergaben eine geringe Anzahl lebensfähiger Protoplasten. Die in dieser Arbeit für die Isolierung von Mesophyllprotoplasten hauptsächlich angewendete Methode unterschied sich von der für die Protoplasten aus Zellkulturen nur durch eine Vorplasmolyse des Blattmaterials und geringere Enzymkonzentrationen (0.1% Macerozym und 0.5% Cellulase). Durch die 1-2 stündige Vorplasmolyse konnte, wie auch bei Coutts 1974 beschrieben, die Qualität der Protoplasten deutlich verbessert werden. Außerdem war es möglich, auf diese Weise spontane Fusionen weitgehend zu verhindern. Bei Versuchen, Mesophyllprotoplasten durch getrennte Anwendung der Enzyme zu isolieren (Nagata und Takebe 1969, Zweistufenmethode), wurden spontane Fusionen ebenfalls verhindert. Die kombinierte Anwendung der Enzyme Cellulase und Macerozym (Einstufenmethode) hatte jedoch den Vorteil, daß ein Wechseln der Enzyme nicht erforderlich war, und die Isolierung daher gut über Nacht durchgeführt werden konnte.(16 Stunden, 22°C). Außerdem wurden mit der Einstufen-Methode größere Ausbeuten erzielt, da auch die Schwammparenchymzellen Protoplasten freisetzten. Diese Isolierungsmethode , lange Inkubationszeit mit geringer Enzym-

konzentration, bewirkte gegenüber der von Nagata und Takebe (1969) beschriebenen Zweistufenmethode (relativ hohe Enzymkonzentrationen, jedoch kurze Isolierungszeit) kein unterschiedliches Verhalten der Protoplasten während der Kultur. Die Isolierung der Protoplasten mit Meicellase statt Cellulase Onozuka R10, machte Unterschiede in der Enzymaktivität der Präparate deutlich. Meicellase mußte in 4% iger Lösung verwendet werden, damit vergleichbare Ausbeuten wie mit Cellulase erzielt wurden. Wie auch bei den Protoplasten aus Zellkulturen beobachtet werden konnte, war der physiologische Zustand des Zellmaterials für den Erfolg der Isolierung entscheidend. Der physiologische Zustand des Tabak- und Petuniablattmaterials änderte sich mit der Entwicklung der Pflanzen. Zur Isolierung und Kultur von Mesophyllprotoplasten eigneten sich 50 - 70 Tage alte Tabak-,bzw. 30 - 50 Tage alte Petuniapflanzen am besten. Isolierungs- und auch Kulturversuche mit Protoplasten aus Pflanzen kurz vor oder während der Blüte ergaben einerseits nur geringe Ausbeuten an Protoplasten, die überdies kaum teilungsfähig waren.

Neben diploiden Samenpflanzen von Nicotiana tabacum cv. Badischer Burley und Petunia hybrida cv. satellite wurden auch haploide Tabakpflanzen der o.g. Varietät, die durch Antherenkultur erhalten worden waren, als Material für die Isolierung und Kultur von Protoplasten genutzt. Es wurden Parallelversuche mit haploiden und diploiden Protoplasten durchgeführt und deren Eigenschaften und Kulturverhalten untersucht. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, war es erforderlich, etwa gleichaltriges Material zu verwenden. Haploide Pflänzchen wurden zur Zeit des Topfens den nach 4 - 5 Tagen erhaltenen Keimpflanzen aus Samen gleichgestellt. Die Aufzucht der Pflanzen erfolgte unter völlig gleichen Bedingungen.



Figur 1 : Häufigkeitsverteilung der Größe haploider und diploider Tabakmesophyllprotoplasten, die von 58 bis 71 Tage alten Pflanzen isoliert worden waren. haploid diploid.

Ausbeute und Größe

Am 58.,59.,64. und 71. Kulturtag der haploiden und diploiden Tabakpflanzen wurden von etwa gleichgroßen Blättern Protoplasten isoliert. Die Ausbeute betrug in den haploiden als auch diploiden Ansätzen zwischen 10^5 und 6.10^5 intakte Protoplasten/ g Blattmaterial. Diese Werte wurden nach Entfernung der Enzymlösung und Zentrifugation der Protoplasten in Saccharoselösung zur Abtrennung beschädigter Zellen ermittelt, und sind daher relativ niedrig. Die ursprüngliche direkt in der Enzymlösung ermittelte Protoplastenausbeute lag zwischen 5.10^5 und 3.10^6 Protoplasten pro g Blattmaterial.

Untersuchungen über die Häufigkeitsverteilung der Größe haploider und diploider Protoplasten (Fig. 1) zeigte, daß bei allen 4 Ansätzen die diploiden Protoplasten durchschnittlich etwas größer als die haploiden waren. Die Durchschnittsgröße variierte zwischen 26 und 32 µ bei den diploiden und 24 und 30 µ bei den haploiden Protoplasten. (Tab. 6)

Tabelle 6: Mittlerer Durchmesser haploider und diploider Tabakmesophyllprotoplasten.

Alter der Pflanzen	Haploid	diploid
58 Tage	29 µ	32 µ
59 Tage	26 µ	32 µ
64 Tage	24 µ	26 µ
71 Tage	28 µ	29 µ

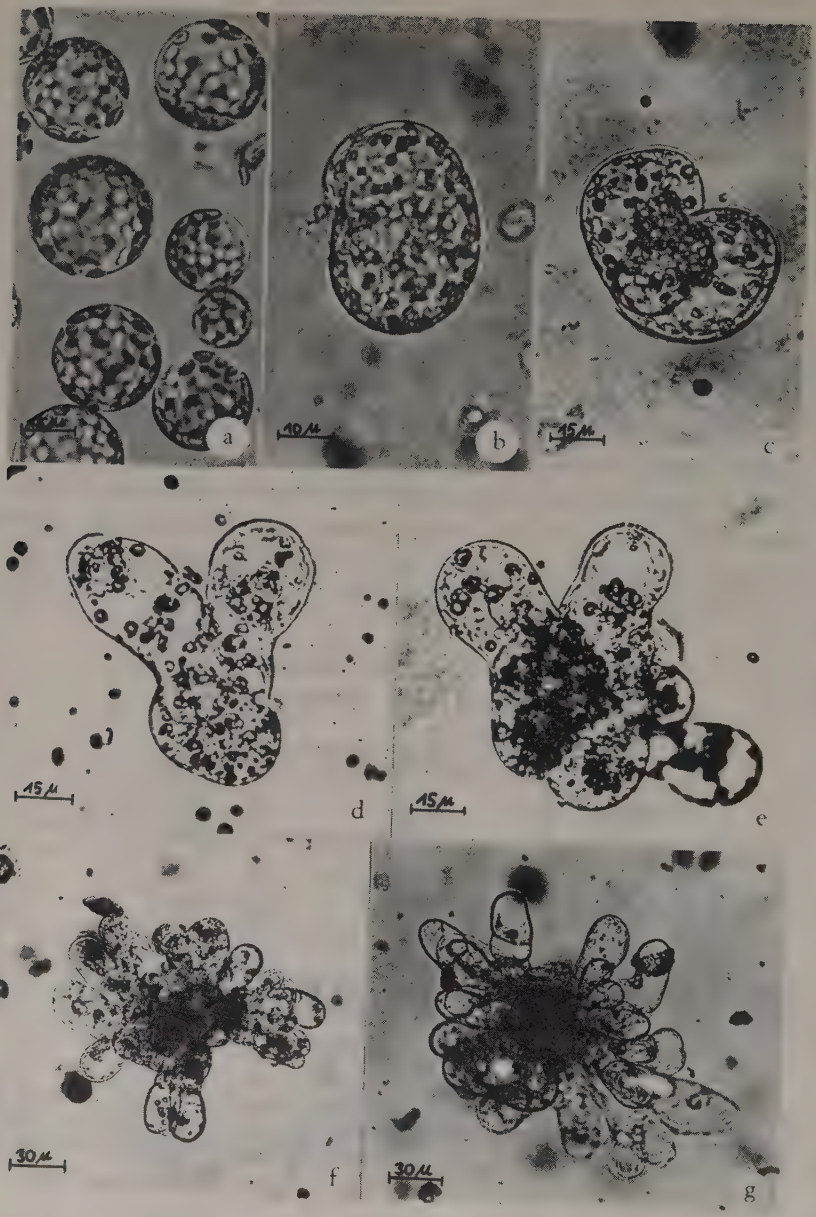


Abb. 9 : Kultur isolierter Tabakmesophyllprotoplasten. a) Nach 16 stündiger Inkubation epidermisfreier Tabakblätter in 0.1% Macerozym, 0.5% Cellulase und 13% Mannit in CPW Salzlösung erhaltene Tabakmesophyllprotoplasten. b) Zellwandregeneration 24 Stunden nach der Isolierung der Protoplasten. c) Erste Zellteilung nach 48 stündiger Kultur in TP- Agarmedium. d-g) Verschiedene Stadien der Koloniebildung eines im Agarmedium markierten Protoplasten innerhalb von 20 Kulturtagen.

Kultur haploider und diploider Tabakmesophyllprotoplasten. Für die Kultur wurden die Mesophyllprotoplasten (Abb. 9a) mit einer Dichte von 7.10^4 Protoplasten / ml Medium in Nagata Takebe 1971 Agarmedium (TP) mit 10% Mannit in Plastikpetrischalen plattiert. Sie wurden für 16 Stunden im Dunkeln bei 28°C, dann für 48 Stunden in einer Klimakammer mit 500 lux verwahrt. Während dieser Zeit bildeten die Protoplasten Zellwände (Abb.9 b) und die ersten Zellteilungen konnten beobachtet werden. (Abb. 9 c). Nachfolgend wurden die Kulturen bei 2000 lux und 25 °C im 16 zu 8 Stunden Hell- Dunkel Rythmus gehalten. Wurden die Mesophyllprotoplasten direkt nach der Isolierung in Licht von 2000 lux gebracht, so starben sehr viele ab. Die stufenweise Erhöhung der Lichtintensität erwies sich dagegen als wachstumsfördernd. Gegenüber den Protoplasten aus Zellkulturen waren die Mesophyllprotoplasten während der ersten Kulturtage etwas wachstumsfreudiger. Zellwandregeneration setzte direkt nach der Isolierung ein, und die ersten Teilungen konnten in einigen Fällen schon nach 16 Stunden beobachtet werden. Die haploiden und diploiden Protoplasten zeigten keinen Unterschied bezüglich der bis zur ersten Teilung benötigten Zeit. Im Verlauf der weiteren Kultur wurde jedoch eine gewisse Überlegenheit der diploiden Protoplasten deutlich. Innerhalb einer Woche hatten sich die diploiden Zellen häufiger als die haploiden geteilt. Die Kolonien bestanden aus 20- 25 bzw. 15- 20 Zellen.

Plattierungseffizienz

Zum besseren Vergleich der Teilungsaktivität der Protoplasten wurde nach 12 Kulturtagen ermittelt, wie viele der lebenden Zellen die Fähigkeit besaßen, sich zu teilen. ("Plating Efficiency", Nagata und Takebe 1969). Als Mittelwerte aus 4 zeitlich verschobenen Ansätzen wurde für diploide Protoplasten eine Plating Efficiency von 68.2% und für haploide von 56.9% ermittelt. (Tab. 7)

Abb. 10 : a-d) Regeneration haploider und diploider Tabakpflänzchen 4 Wochen nach der Übertragung auf Differenzierungsmedium. e,f) Cytologische Untersuchung der Wurzelspitzen regenerierter Tabakpflanzen. e) Metaphase einer haploiden Pflanze (2n = 24). f) Metaphase einer diploiden Pflanze (4n = 48).

Tabelle 7: Plattierungseffizienz haploider und diploider Tabak-Protoplasten nach 12 Kulturtagen.

Alter der Pflanzen	58 Tage	59 Tage	64 Tage	71 Tage
Haploid	58 %	54.4 %	62.2 %	53 %
Diploid	69 %	65 %	72 %	67 %

Mittelwerte aus 400 gezählten Zellen und Kolonien in 2 Petrischalen.

Nach etwa 20 Kulturtagen zeigten die inzwischen stecknadelkopf großen Kolonien eine Wachstumshemmung. Es war erforderlich, sie auf frisches Medium zu übertragen.Die Arbeit mit Protoplasten aus Zellkulturen hatte gezeigt, daß eine Erniedrigung der Plasmolytikumskonzentration des Kulturmediums stimulierend auf die Teilungsaktivität der Zellen wirkte. Die aus einzelnen Protoplasten regenerierten haploiden bzw. diploiden Kolonien wurden daher auf TP Medium, das nur 0.2M Mannit enthielt,übertragen. Bei den diploiden Kulturen konnte nach 2-3 Tagen eine verstärkte Teilungsaktivität festgestellt werden, im Gegensatz zu den haploiden Kolonien, die wahrscheinlich durch den osmotischen Schock bei der Übertragung von dem 0.55M Medium auf das 0.2M Medium zum größten Teil abstarben. Eine Aktivierung der Teilungsaktivität konnte allein durch die Übertragung einzelner Kolonien auf frisches 0.55M Medium erzielt werden. (Tab. 8)

Tabelle 8: Einfluß der Molarität des Kulturmediums auf die Fähigkeit einzelner haploider und diploider, aus Protoplasten regenerierter Kolonien,Klone zu bilden.

Medium	Haploid	Diploid
TP 0.2 M	12.3 %	73 %
TP 0.55M	65.3 %	-

Abb. 11 : Kallusbildung und Regeneration intakter Pflanzen von isolierten Protoplasten von Petunia hybrida. a) Kallusbildung nach Übertragung der aus Protoplasten erhaltenen Kolonien auf TP- Medium mit 0.2M Mannit. b) Regeneration von Wurzeln nach Übertragung der Kalli auf T3 - Medium. c) Sprofbildung auf TP- Medium mit 0.5 mg/l BAP. d) Von Petuniaprotoplasten regenerierte Pflänzchen, 40 Tage nach dem Topfen der Schößlinge. e) Blühende Petuniapflanze, 5 Monate nach der Isolierung der Protoplasten.

Organogenese

Die durch "Klonen" von haploiden und diploiden Protoplasten erhaltenen Kalli von 0.5 bis 1 cm Durchmesser wurden zur Induktion der Organogenese auf MS Basalmedium mit 2mg/l Kinetin und 2 mg/l IES [a] übertragen. (T3 Medium). Nach 5-wöchiger Kulturzeit waren bei den diploiden und haploiden Kulturen Sprosse gebildet worden. Die Anzahl sproßbildender Kalli wurde bestimmt. (Tab. 9) (Abb. 10a, b und d)

Tabelle 9: Bestimmung des Anteils sproßbildender Kolonien nach 5 Wochen Kultur auf Differenzierungsmedium (T3).

	Haploid	Diploid
Anzahl der Kolonien	108	220
Kolonien mit Sprossen	56	112
Prozent	52	50.9

Wurzelbildung erfolgte in den meisten Fällen erst nach der Übertragung der Sprosse auf Whites Medium (1954) ohne Zusatz von Phytohormonen innerhalb von 8 Tagen (Abb. 10c). Die regenerierten Pflänzchen wurden getopft und im Gewächshaus kultiviert. Von den 99 getopften diploiden Schösslingen wuchsen 79 an. Von den haploiden Schösslingen konnten 42 getopft werden, von diesen konnten 32 aufgezogen werden. 23 der diploiden Pflanzen wurden nach ausreichender Wurzelbildung an Hand der Wurzelspitzen cytologisch untersucht. Das Karyogramm zeigte keine Veränderung in Zahl und Gestalt der Chromosomen(Abb. 10 e), noch konnten Anomalitäten im Habitus der Pflanzen beobachtet werden. Die 32 aus haploiden Mesophyllprotoplasten regenerierten Pflanzen wurden ebenfalls cytologisch untersucht. 15 der Pflanzen waren haploid (2n = 24) (Abb. 10f), 17 waren infolge Endoploidie diploid, sie enthielten 48 Chromosomen. Jeweils 5 haploide und diploide Pflanzen wurden bis

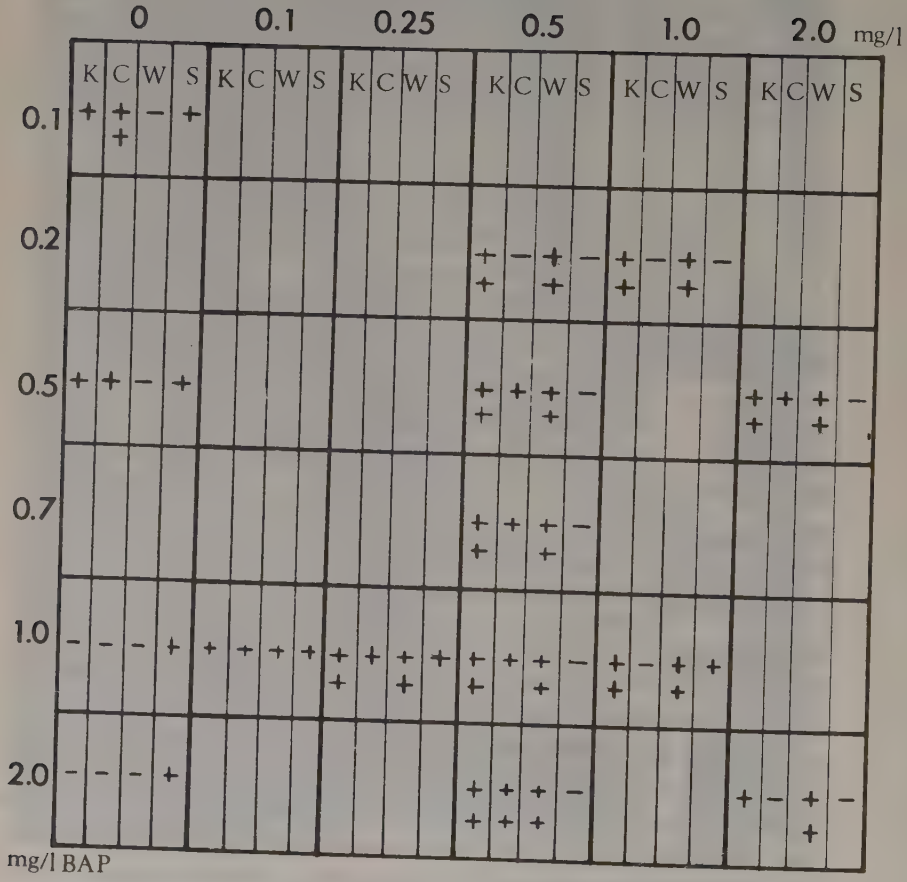


Tabelle 10 : Effekt der BAP und NAA Konzentration auf Petunia-kalli, welche aus Protoplasten regeneriert worden waren.
K = Kallusbildung, C = Chlorophyllsynthese, W = Wurzelbildung, S = Sproßbildung. ++ = 100%, + = 50% , - = 0%

zur Blüte weiter kultiviert. Die vom Topfen der Sprosse bis zur Blüte der Pflanzen benötigte Zeit entspricht mit 4 Monaten der für die Aufzucht von Samenpflanzen erforderlichen Zeit. Insgesamt wurden von der Isolierung der Protoplasten bis zur Blüte der regenerierten Pflanzen 7 -8 Monate benötigt.

Petunia hybrida

Kulturversuche mit isolierten Protoplasten von Petunia hybrida cv. satellite ergaben, daß sie unter den gleichen Kulturbedingungen, die für Tabak als optimal ermittelt worden waren, Zellwände regenerierten, sich teilten und Kallus bildeten.

Differenzierung

Die Induktion von Sprossen in den aus Petunia Protoplasten regenerierten Kalli erwies sich als schwieriger als bei Tabak. Nach der Übertragung auf T3 Medium konnte in den Petuniakalli nur eine verstärkte Chlorophyllsynthese mit nachfolgender Wurzelbildung beobachtet werden. Es war daher erforderlich, ein für die Sproßbildung induktives Verhältnis von Auxin und Cytokinin, als auch eine optimale Konzentration der Phytohormone zu ermitteln. (Tab. 10)
Medien, denen nur Cytokinin zugesetzt war, konnten Sproßbildung induzieren. 0.5 mg/l BAP[b] bewirkte in 13% der Kalli Regeneration von Sprossen, dabei wurden in keinem der Kalli Wurzeln regeneriert. Medium mit nur 0.1 mg/l Auxin (NAA) und einer 10 fachen Konzentration an Cytokinin (1 mg/l BAP) induzierte in 6% der Kalli Sprosse. Weitere Erhöhung der Auxinkonzentration im Kulturmedium reduzierte die Bereitschaft der Kalli, Sprosse zu bilden. Schon 0.2 mg/l NAA bewirkte in 100% der Kalli Wurzelregeneration und nur vereinzelte Sproßbildung. Bewurzelte Petuniasprosse wurden getopft, (Abb. 11d) und konnten zu intakten blühenden Pflanzen aufgezogen werden. (Abb. 11e)

a) IES - Indolessigsäure
b) BAP - Benzylaminopurin

Figur 2: Effekt verschiedener Fusionsmittel auf die Anzahl fusionierter Protoplasten.
Karottenprotoplasten, Tabakprotoplasten

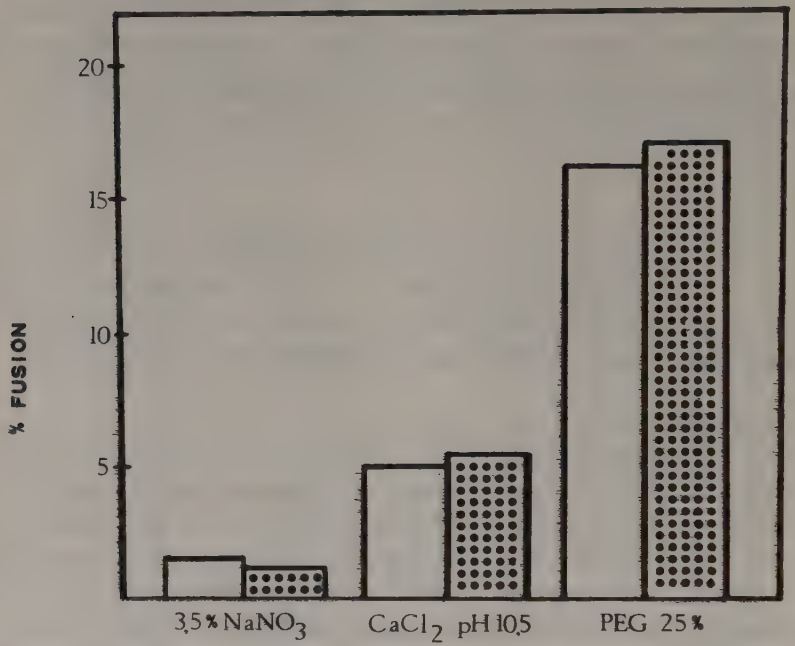


Tabelle 11: Ermittlung einer optimalen Fusionsmethode unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien.

	Agglutinationswirkung		Fusionswirkung		Lebensfähigkeit	
	Karotte	Tabak	Karotte	Tabak	Karotte	Tabak
$NaNO_3$	+	+	+	+	+	+
$CaCl_2$ pH	+ +	+ +	+ +	+++	-	-
PEG	+++	+++	+++	+++	+ +	-

3.2. Fusionen von Protoplasten

3.2.1. Ermittlung einer optimalen Fusionsmethode

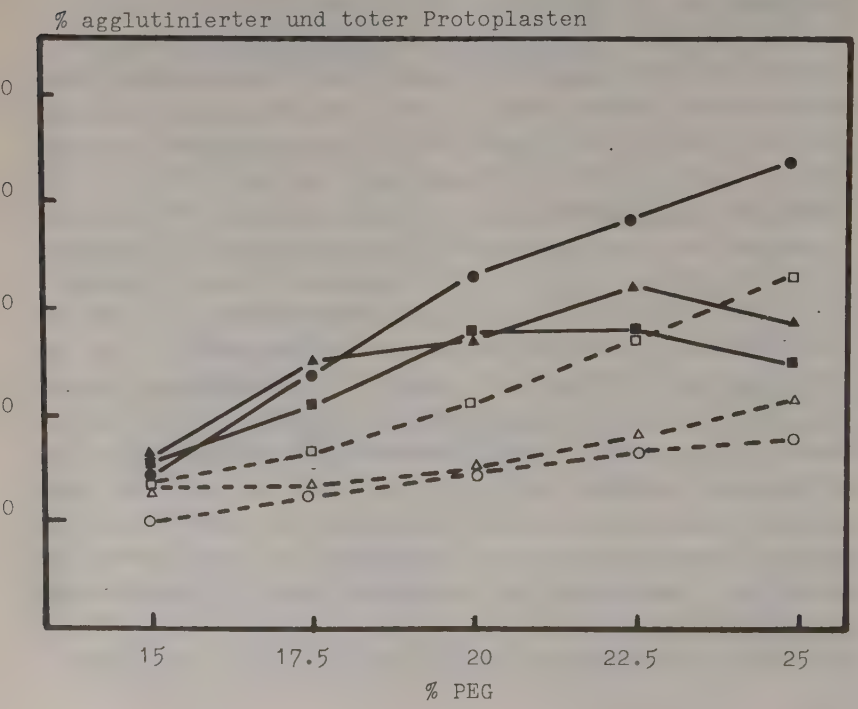
Voraussetzung für die Möglichkeit der Aufzucht somatischer Hybridpflanzen ist die Fusion zweier somatischer Zellen. Da bei isolierten Protoplasten verschiedener Species die Möglichkeit einer spontanen Fusion nicht gegeben ist, wurde versucht, eine reproduzierbare Fusionsmethode zu ermitteln, die eine hohe Anzahl fusionierter Protoplasten ergab und gleichzeitig die Lebensfähigkeit der Protoplasten wenig beeinträchtigte. Es wurden drei in der Literatur beschriebene Methoden, $NaNO_3$ (Power, Cummins und Cocking 1970), $CaCl_2$ pH 10.5 (Keller und Melchers 1973) und Polyäthylenglykol (PEG) (Kao und Michayluk 1974 und Wallin, Glimelius und Eriksson 1974) angewendet und bezüglich der genannten Forderungen beurteilt.

Vergleich verschiedener Fusionsmethoden
Karotten und Tabakprotoplasten wurden voneinander getrennt mit verschiedenen Fusionsmitteln, $NaNO_3$, $CaCl_2$ und PEG behandelt. Die Bestimmung der Anzahl durch Fusionen gebildeter Homokaryonten zeigte deutliche Unterschiede in der Effektivität der einzelnen Substanzen und den entsprechenden Methoden auf. Mit $NaNO_3$ wurde eine Fusionsrate von nur 1.5%, mit $CaCl_2$ Lösung pH 10.5 dagegen 5.5% ermittelt. Die Behandlung der Protoplasten mit einer 50% igen PEG Lösung ergab 17% fusionierter Protoplasten. (Fig. 2). Die Ergebnisse dieser Versuche wurden an fixiertem und feulgengefärbtem Material ermittelt, und ließen keine Beurteilung der Lebensfähigkeit zu. Die Beurteilung der Fusionsmittel bezüglich der Anzahl agglutinierter, fusionierter und lebensfähiger Protoplasten ist in Tabelle 11 dargestellt. Neben der absoluten Überlegenheit der PEG Methode bezüglich der Agglutinations- und Fusionswirkung gegenüber den beiden anderen Methoden wurde jedoch deutlich, daß die Lebensfähigkeit der Mesophyllprotoplasten ebenso wie durch $CaCl_2$ auch durch PEG vermindert wurde. Protoplasten aus Zellkulturen von Daucus carota wiesen dagegen kaum Schädigungen durch die Behandlung mit PEG auf. Es sollte daher das

Ziel der folgenden Versuche sein, die als optimal erachtete PEG Methode so zu verbessern, daß hohe Fusionsraten bei möglichst geringer Schädigung aller beteiligten Protoplasten möglich war

Konzentration der PEG Lösung.
Maximale Ausbeuten agglutinierter, lebensfähiger Mesophyllprotoplasten wurden mit PEG Konzentrationen von 40- 45% erreicht. Durch die Verwendung höherer PEG Konzentrationen nahm die Anzahl lebender agglutinierter Mesophyllprotoplasten ab. Karottenprotoplasten zeigten dagegen mit höheren PEG Konzentrationen eine proportionale Zunahme agglutinierter Protoplasten. Die Lebensfähigkeit wurde nur geringfügig beeinträchtigt. (Fig.3)

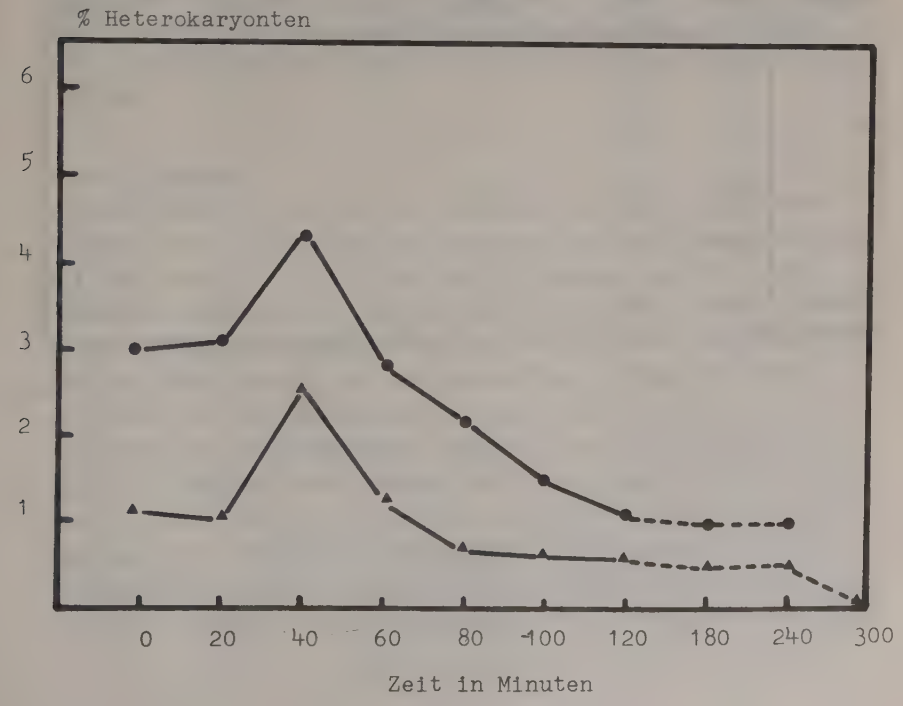
Figur 3: Einfluß der PEG Konzentration auf die Anzahl agglutinierter und toter Protoplasten. ●—● agglutinierte ○---○ tote Karottenprotoplasten, ■—■ agglutinierte □---□ tote Tabakprotoplasten, ▲—▲ agglutinierte △---△ tote Petuniaprotoplasten.



Zeit nach der Isolierung der Protoplasten

Protoplasten wurden zu verschiedenen Zeiten nach der Entfernung des Enzyms mit der PEG Lösung versetzt, und die Anzahl der Heterokaryonten aus Tabak-und Karottenprotoplasten wurde in vivo und nach Fixierung und Feulgenfärbung ermittelt. Die beiden Maximalkurven (Fig. 4) zeigten einen parallelen Verlauf. Die niedrigeren nach Feulgenfärbung erhaltenen Werte geben den Prozentsatz an Heterokaryonten aller vorhandenen Protoplasten an, die in vivo ermittelten Werte den Prozentsatz aller nach derPEG Behandlung noch lebenden Protoplasten Maximal 4.5 bzw. 2.5% Heterokaryonten konnten erzielt werden, wenn die Protoplasten 40 Minuten nach der Entfernung der Enzymlösung mit der PEG Lösung versetzt wurden. Protoplasten, die 60 Minuten und länger aus dem Enzym isoliert worden waren, zeigten mit zunehmender Zeit eine deutliche Abnahme der Fusionsbereitschaft.

Figur 4 : Einfluß der Zeit nach der Isolierung von Tabak- und Karottenprotoplasten auf die Bildung von Heterokaryonten. ●—● in vivo ▲—▲ nach Feulgenfärbung



Dauer der PEG Behandlung

Die Anzahl der Heterokaryonten aus Tabak- und Karotten-,und Atropa- und Petuniaprotoplasten wurde in Abhängigkeit der Dauer der PEG Behandlung bestimmt. Bei Behandlungszeiten zwischen 10 und 45 Minuten konnten in keinem der Partnerschaftssysteme weder signifikante Unterschiede in der Lebensfähigkeit der Protoplasten noch in der Anzahl der Heterokaryonten festgestellt werden. (Tabelle 12) Da für die technische Durchführung der Behandlung etwa 15 Minuten erforderlich waren, wurde diese Zeit in den folgenden Versuchen eingehalten.

Tabelle 12: Effekt der PEG Behandlungszeit auf die Anzahl fusionierter und toter Protoplasten.

Zeit in Minuten	Tabak tot	Karotte tot	Heterok. Tab/Kar.	Petunia tot	Atropa tot	Heterok. Pet/Atr.
10	46.6	35	7.8	42	34.5	9
15	51	28	6.5	-	-	-
20	48.2	30	8.2	-	-	-
30	47.9	25	8.5	-	-	-
45	43	33	7	47	36.8	8.8

Einfluß des Auswaschens der PEG Lösung

Die Behandlung von Protoplasten mit 45% iger PEG Lösung bewirkte starke Agglutination und auf Grund des hohen osmotischen Wertes des PEGs einen Wasserverlust der Protoplasten. Der folgende Versuch sollte klären, ob die Fusionswirkung der PEG Behandlung durch die Substanz selbst bedingt war, oder erst die Deplasmolyse der stark geschrumpften Protoplasten während des Waschens zur Fusion führte. Es wurde daher die Anzahl fusionierter Protoplasten direkt in der PEG Lösung und nach vollendetem Waschvorgang bestimmt. In beiden Fällen wurden bei mehreren Versuchsansätzen Fusionsraten von 5-9% erhalten. Eine fusionsfördernde Wirkung des Waschens konnte nicht festgestellt werden. Der Waschvorgang hatte jedoch Bedeutung für die Lebensfähigkeit der Protoplasten. Die abrupte Entfernung der PEG Lösung und der direkte Austausch gegen Waschlösung oder Kulturmedium bedeutete einen osmotischen Schock für die Protoplasten, so daß sie auch noch nach Beendigung des eigentlichen Fusionsvorganges platzten. Ein schonenderes Verfahren des Waschens dagegen war die stufenweise Erniedrigung der PEG Konzentration durch langsame Zugabe von Waschlösung. Die Verwendung von $CaCl_2$ Lösung pH 10.5 als Waschlösung führte zu keiner Steigerung der Fusionsrate.

Zentrifugation

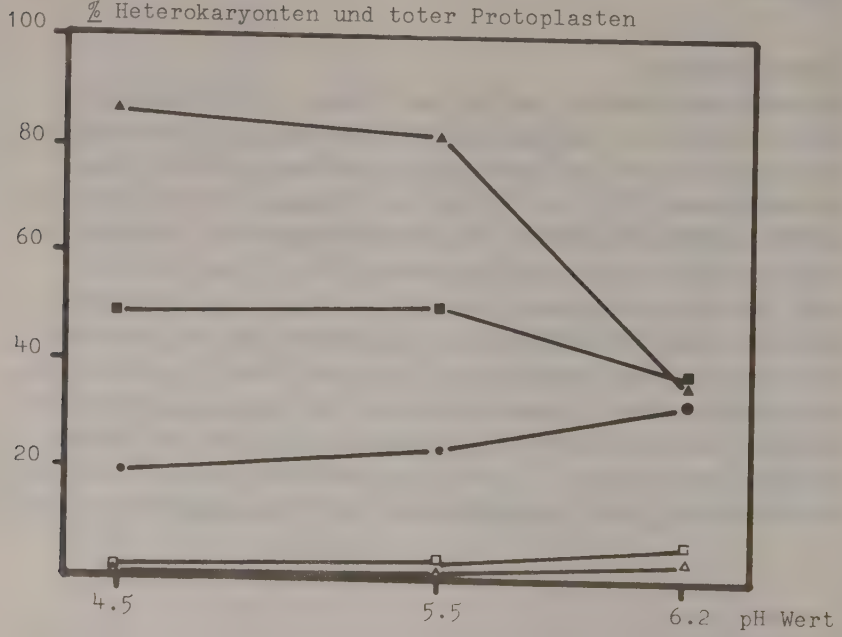
Ein weiterer Faktor, der für das Platzen der Protoplasten verantwortlich zu machen war, war das häufige Zentrifugieren, das zum Zweck der vollständigen Entfernung der PEG Lösung notwendig war. Mit der Von Kao und Michayluk (1974) beschriebenen Mikrotropfenmethode konnten Protoplasten, nachdem sie isoliert und gemischt worden waren,(Abb. 11 und 12 a) sowohl den Fusionsvorgang als auch die nachfolgenden Waschungen ohne eine Zentrifugation durchlaufen. Die Protoplasten zeigten eine bedeutend bessere Lebensfähigkeit, so daß sogar eine Erhöhung der Konzentration der PEG Lösung,welche durch Mischen von Protoplastensuspension und 45% iger PEG Lösung im Verhältnis von 1:3 (zuvor 1:2) erreicht wurde, keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Protoplasten zur Folge

hatte. Die Intensität der Aggglutinations- und Fusionswirkung (Abb. 11 und 12 b) wurde darüber hinaus gesteigert. In den folgenden Versuchen wurde ausschließlich mit der Mikrotropfenmethode gearbeitet, und die Anzahl der Heterokaryonten konnte auf maximal 8 -10 % aller lebenden Protoplasten erhöht werden.

pH der PEG Lösung

Der Pufferungsbereich der Kulturmedien für Zellen und Protoplasten lag bei pH 5.5 bis 5.8. Ein Versuch klärte, bei welchem pH Wert der PEG Lösung eine optimale Fusionswirkung und gleichzeitig die geringste Schädigung der Protoplasten auftrat. Es wurden PEG Lösungen mit den pH Werten 4.5, 5.5, 6.2 verwendet und die Anzahl der Lebenden, als auch der Heterokaryonten bestimmt. Bei der Behandlung mit PEG Lösung pH 4.5 starben 87% der Mesophyllprotoplasten ab. Folglich war auch die Anzahl gebeildeter Heterokaryonten sehr gering. (Fig 5)

Figur 5: Einfluß des pH Wertes der PEG Lösung auf die Anzahl gebildeter Heterokaryonten und toter Protoplasten ▲—▲ tote Petunia Protoplasten, ■—■ tote Atropa Protoplasten ●—● tote Karottenprotoplasten, Heterokaryonten aus Atropa und Petunia □—□ Heterokaryonten aus Karotten und Petunia. △—△



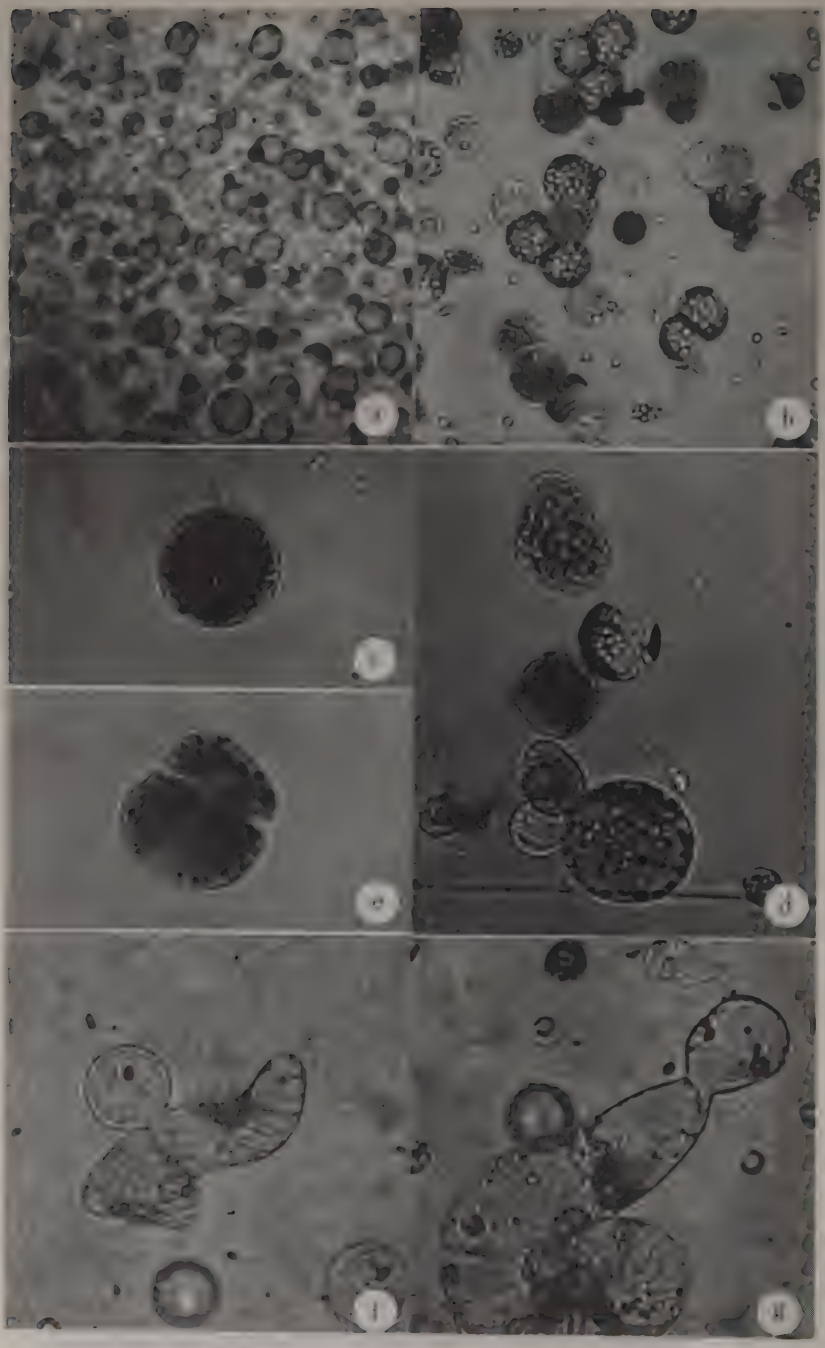
Bei pH 6.2 wurde dagegen für die drei untersuchten Protoplastentypen nur 32 - 37% toter Protoplasten ermittelt. Entsprechend war auch ein Anstieg der Anzahl gebildeter Heterokaryonten zu beobachten. Die Unterschiede zwischen pH 4.5 und 6.2 waren in allen Fällen signifikant.

3.2.2. Kultur von Heterokaryonten

Das phänotypische Merkmal der Farbe der in dieser Arbeit verwendeten Protoplasten, (Atropa- farblos, Karotte- rot, Tabak und Petunia - grün), erlaubte für eine gewisse Zeit die Identifizierung der gebildeten Heterokaryonten während der Kultur zusammen mit den Homokaryonten und den nicht fusionierten Protoplasten, so daß es möglich war, einige, die Kultur der Heterokaryonten beeinflussende Faktoren zu untersuchen.

Konsistenz des Kulturmediums
Bei der Kultur der PEG behandelten Protoplasten in flüssigem TP- Medium und in 0.6% igem Agarmedium der gleichen Nährstoffzusammenstzung wurden Unterschiede im Verhalten deutlich. Im Agarmedium war die Teilungsaktivität der nicht fusionierten Protoplasten reduziert. Heterokaryonten waren wenig lebensfähig. In der Suspension zeigten die Heterokaryonten bedeutend größere Vitalität, sie waren für 15 -20 Tage lebensfähig und regenerierten zum Teil Zellwände. (Abb. 12 d). Obwohl die individuelle Beobachtung, wie es durch Markierung von Heterokaryonten im Agarmedium möglich war, in der Suspension nicht gegeben war, wurde auf Grund ihres besseren Verhaltens die Protoplasten ausschließlich in flüssigem Medium kultiviert.

Zusammensetzung des Mediums
Die PEG behandelten Protoplasten wurden in TP- Medium, das zusätzlich 2%, 4% und 6% Kokosnußmilch, oder 0.0 25% und 0.1% Edamin, oder Kombinationen beider Substanzen enthielt, kultiviert. Die Beurteilung von 10 Versuchsansätzen ergab, daß TP-Medium mit 2% Kokosnußmilch und 0.1% Edamin für die Kultur der Heterokaryonten am besten geeignet war. 20 -25 % der Karotten/ Tabak-bzw. Petunia-Heterokaryonten, und der Atropa- / Tabak-bzw. Petunia Heterokaryonten teilten sich mindestens einmal (Abb. 12 e).



Eine Beobachtung weiterer Teilungsschritte war sehr schwierig, da die nicht fusionierten Protoplasten sehr teilungsaktiv waren und die Heterokaryonten überwuchsen. Außerdem konnten nach etwa 10-tägiger Kulturzeit die Chloroplasten als Merkmal der Mesophyllprotoplasten auf Grund ihrer Degeneration nicht mehr für die Identifizierung der Heterokaryonten verwendet werden.
Die Verwendung von Glukose und Xylose als Kohlenhydrate und Mannit oder Glukose als osmotisch wirksame Zusätze zeigte weder bei Zusatz zum TP- Medium noch zu dem von Kao und Michayluk (1974) beschriebenem, modifiziertem B5 - Medium einen positiven Effekt auf die Teilungsaktivität der Heterokaryonten.

Protoplastendichte

Die Kultur der Hetero- und Homokaryonten zusammen mit den nicht fusionierten Protoplasten in den von Kao und Michayluk (1975) beschriebenen 7p und 8p Medien, die mit verschiedenen Zuckern, Zuckeralkcholen, organischen Säuren, Aminosäuren, Kokosnußmilch und zusätzlichen Vitaminen angereichert waren ermöglichten eine Verringerung der Protoplastendichte im Kulturmedium auf 1.10^3 / ml, während im TP- Medium mindestens 7.10^3, besser jedoch 1.10^4 Protoplasten erforderlich waren. Die Kultur einzelner Protoplasten, wie sie von Kao und Michayluk (1975) beschrieben worden war, war jedoch nicht möglich. Weiterhin wurde beobachtet, daß eine Kultur mit höheren Protoplastendichten (1.10^5 - 3.10^4)im 7p und 8p Medium sogar Absterben der Protoplasten, wahrscheinlich durch Überkonditionierung zur Folge hatte. Sowohl 7p, 8p und Tp - Medium mit 2% Ko-

Abb. 12 : Fusion von Tabak-und Karottenprotoplasten und Kultur von Heterokaryonten. a) Mischung von Tabak- und Karottenprotoplasten. b) Durch PEG induzierte Agglutinationen. c) Heterokaryont aus einem Tabak- und Karottenprotoplasten. d) Zellwandregeneration der Heterokaryonten nach 2 Kulturtagen. e) Teilung nach 5 Kulturtagen. f und g) Fortgesetztes Wachstum eines Heterokaryonten innerhalb von 10 Tagen.

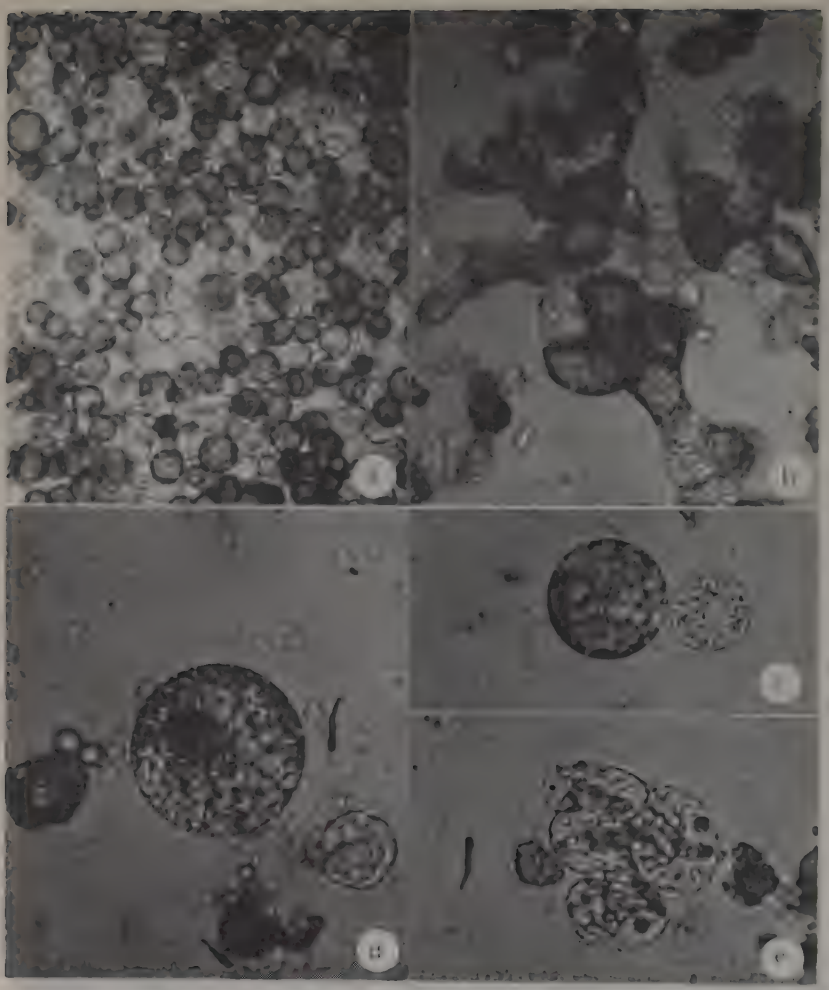


Abb. 12: Fusion von Atropa- und Petuniaprotoplasten und Kultur der Heterokaryonten. a) Mischung von Atropa- und Petuniamesophyllprotoplasten im Verhältnis 1:1. b) Agglutination über große Flächen des Plasmalemmas durch PEG Behandlung. c und d) Heterokaryonten aus Atropa- und Petuniaprotoplasten. e) Von einem Heterokaryonten nach 14 tägiger Kultuzeit gebildete Kolonie.

kosnußmilch und 0.1% Edamin konnten in einigen Fällen aus Heterokaryonten gebildete, mehrzellige Kolonien beobachtet werden. (Abb. 12 f,g und 13 e). Insbesondere dann, wenn Petuniaprotoplasten mit Karotten oder Atropa Protoplasten fusioniert worden waren, da die Petuniaprotoplasten in einigen Fällen über eine längere Kulturzeit Chloroplasten ausbildeten und dieses Merkmal daher weiterhin für die Identifizierung herangezogen werden konnte. Nach spätestens 4 wöchiger Kulturzeit war es jedoch in keinem Fall mehr möglich, regenerierte Kolonien mit Sicherheit als aus Heterokaryonten entstandene zu identifizieren. Zu diesem Zeitpunkt waren dagegen Chimären gut zu erkennen, die deutlich voneinander abgegrenzte Zellen der Elternprotoplasten aufwiesen.
Unabhängig vom Verhalten der Heterokaryonten und der Zelldichte zeigten die Zellen im 7p und 8p Medium während der ersten 14 Tage der Kultur große Vitalität und Teilungsbereitschaft, dann jedoch waren die Zellen im TP Medium teilungsaktiver, so daß in diesem Medium eine schnellere Koloniebildung erfolgte.

Tabelle 13: Einfluß der Protoplastendichte auf das Wachstum von Karotten- Atropa-und Petunia-Protoplasten bei der Kultur in 7p, 8p und TP- Medium mit 2% Kokosnußmilch und 0.1% Edamin

	1.10^5	$2.5.10^4$	$1.5.10^4$	7.10^3	$3.5.10^3$	1.10^3
TP mit 2%KM+ Ed	++	++	++	+	-	-
7p und 8p	+	+	++	++	++	+

(++ 50%, + 25%, - weniger als 10% der Protoplasten in Teilung.

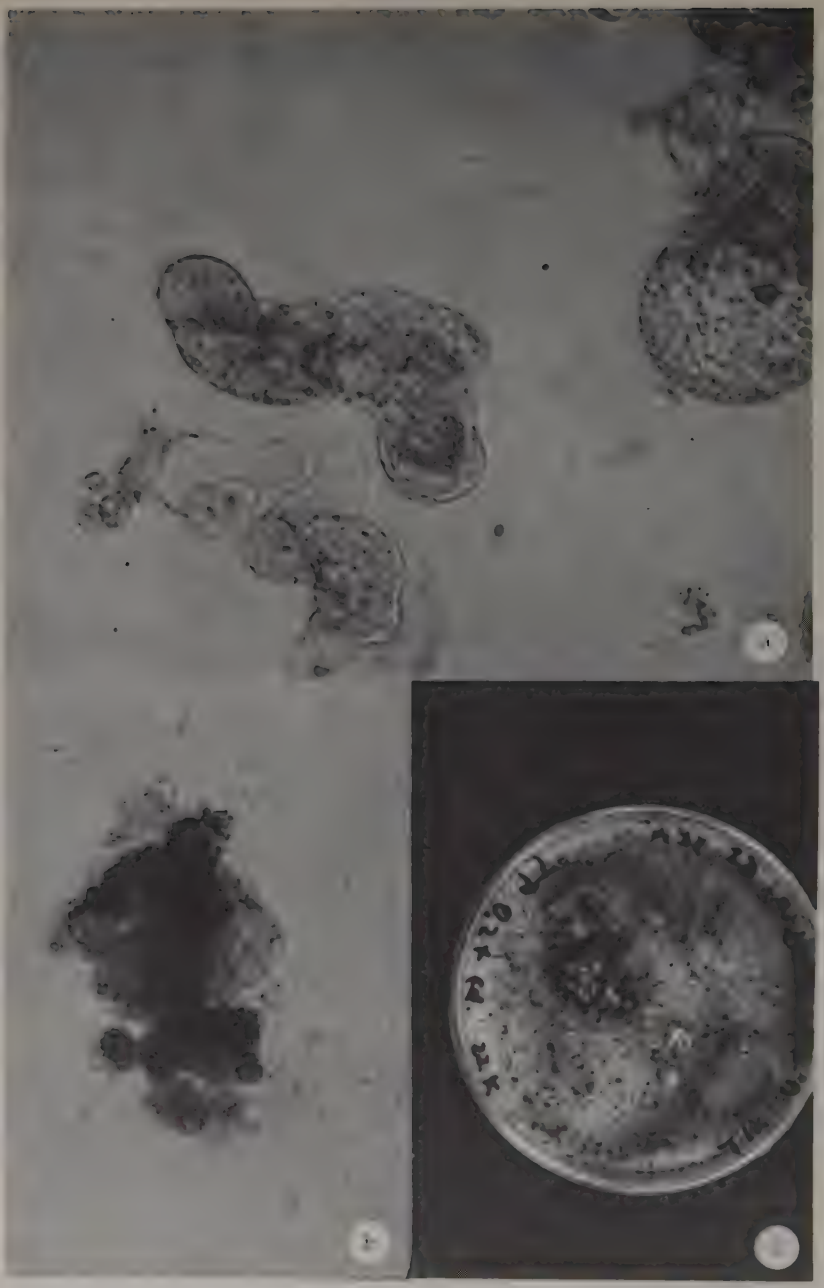


Abb. 14: Teilungswachstum und Kallusbildung PEG behandelter Protoplasten. a) 8 - 10 zellige, aus einem Petunia / Karctten Heterokaryonten nach 10 Kulturtagen gebildete Kolonie. b) Nach 28 Kulturtagen gebildete Kolonie, die auf Grund der Aufspaltung eines Heterokaryonten in Form einer Chimäre wächst. c) Kolonie PEG behandelter Protoplasten nach Übertragung auf Regenerationsmedium.

Mit den vorliegenden Ergebnissen war bewiesen, daß sowohl in interspezifischen Heterokaryonten (Atropa und Petunia bzw. Tabak), als auch in Heterokaryonten aus Protoplasten verschiedener Pflanzenfamilien (Karotten und Petunia bzw. Tabak) Teilungen zu induzieren waren, die zur Koloniebildung führen konnten. Da die Beobachtung der Zellen in vivo jedoch keinen Aufschluß über das Kernverhalten der Heterokaryonten gab, wurden cytologische Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur durchgeführt. Zur Identifizierung diente dabei die unterschiedliche Intensität der Kernfärbung der verschiedenen Species.

Cytologie

Homo- und Heterokaryonten, die in direktem Anschluß an die PEG Behandlung mit Feulgen oder Carbol Fuchsin gefärbt wurden,zeigten deutlich voneinander abgegrenzte Interphasekerne der beteiligten Protoplasten, die unkorreliert in den Protoplasten verteilt waren. (Abb.15a - c). Nach 24 Stunden hatten die meisten Kerne der Hetero- und Homokaryonten sich aneinandergelagert (Abb. 15 d und e) und wurden dicht von Chloroplasten umschlossen. In dieser Position war eine Kernfusion vor der Kernteilung theoretisch möglich, sie war jedoch nie eindeutig zu identifizieren. Die Mitose eines möglicherweise durch Fusion während der Interphase entstandenen tetraploiden Petuniakernes (4n = 28 Chromosomen) ist in Abb. 16 a - c dargestellt.

In 3 - 5 Tage alten Kulturen waren in einigen der ein- und mehrkernigen Zellen Mitosestadien zu erkennen (Abb 17 a und 17 b)zeigen Meta- bzw. Anaphase einer Petunia Zelle, Abb. c und d Metaphasen von Atropa Zellen. (Abb. c , 2n= 72, Abb. d, 4n) Obwohl zu diesem Zeitpunkt der Kultur Kernteilungen in den einzelnen Zellen,aber auch in den inzwischen gebildeten kleinen Kolonien meistens synchron waren, (Abb.17 e) waren aber auch einige nicht synchrone Teilungen in Hetero- als auch Homokaryonten zu erkennen. Abb. 17 f zeigt 2 Atropakerne in Prophase, 5 Petuniakerne dagegen in Metaphase. Außer den hier beschriebenen Teilungen nicht fusionierter Kerne waren aber auch Heterokaryonten zu beobachten, in denen eine deutliche Verschmelzung der Kerne stattgefunden hatte,

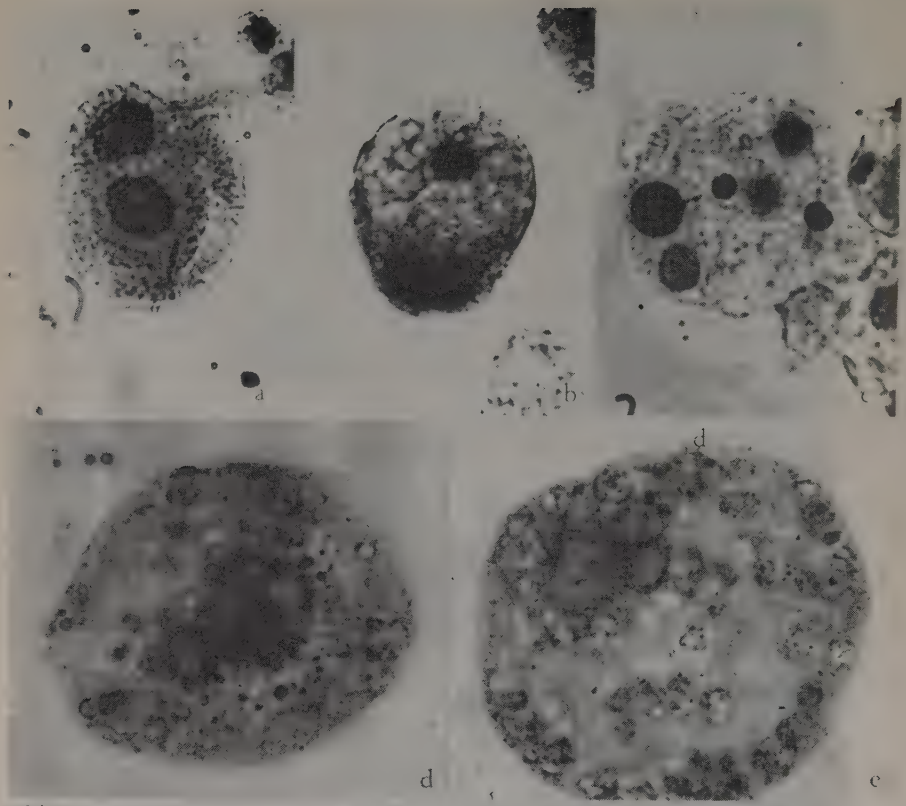


Abb. 15

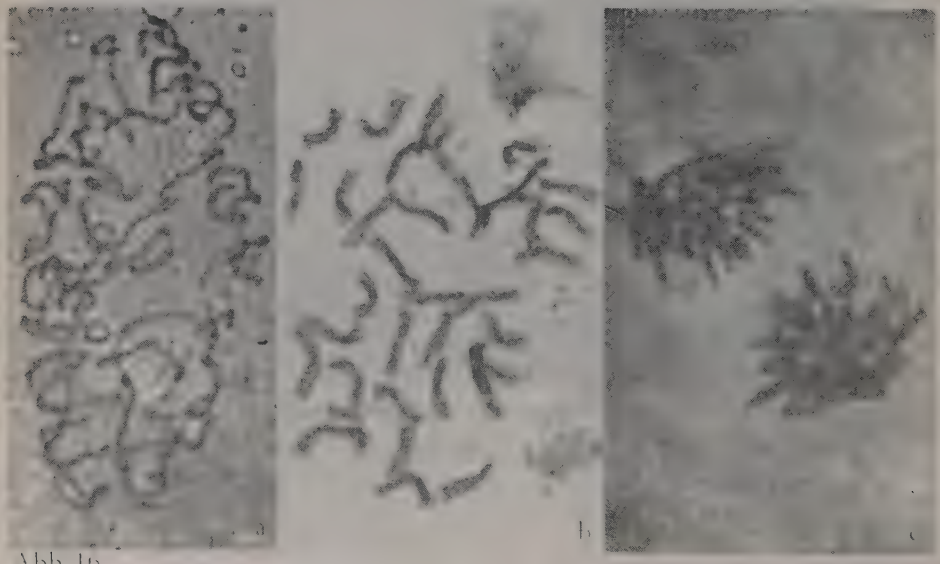


Abb. 16

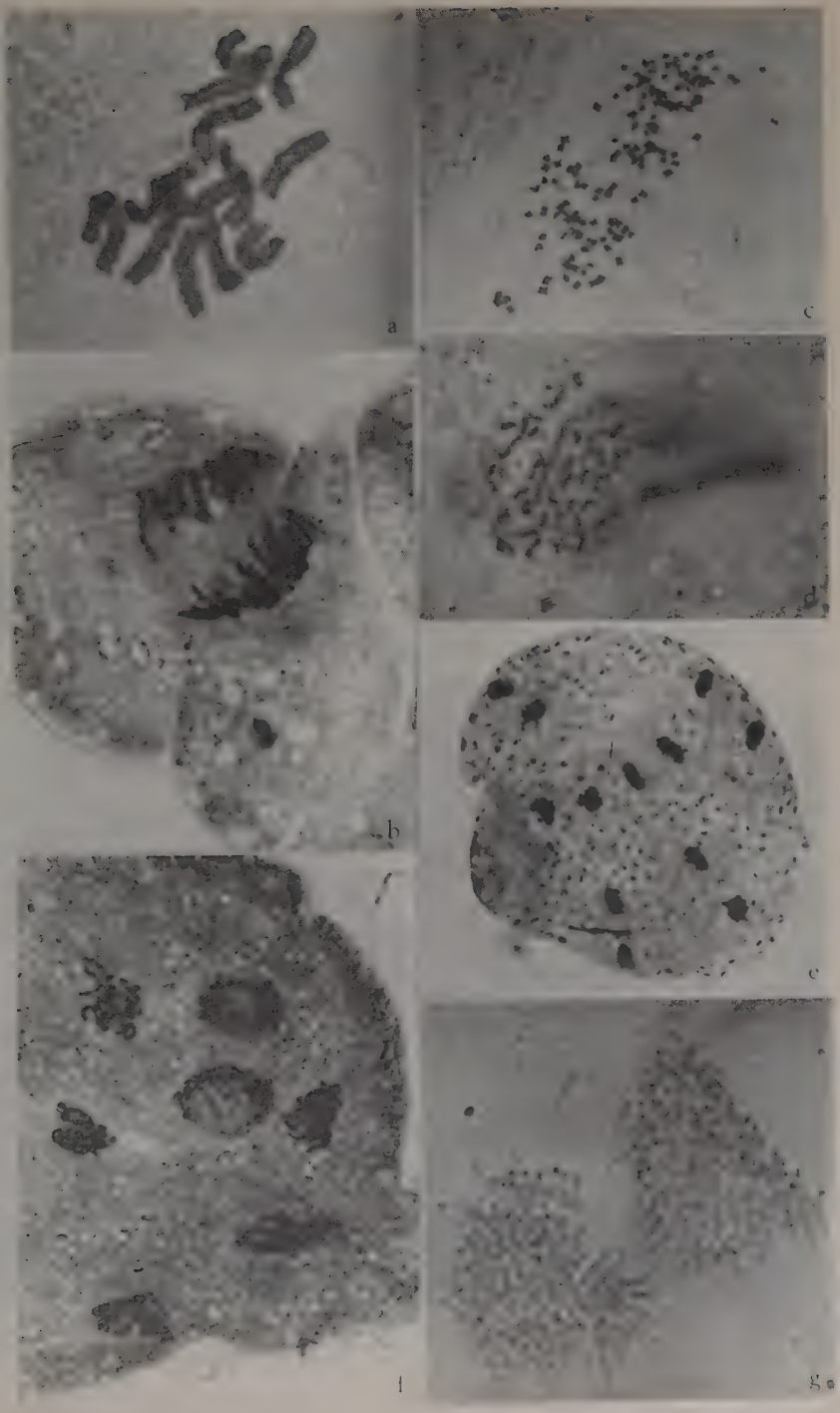


Abb. 17

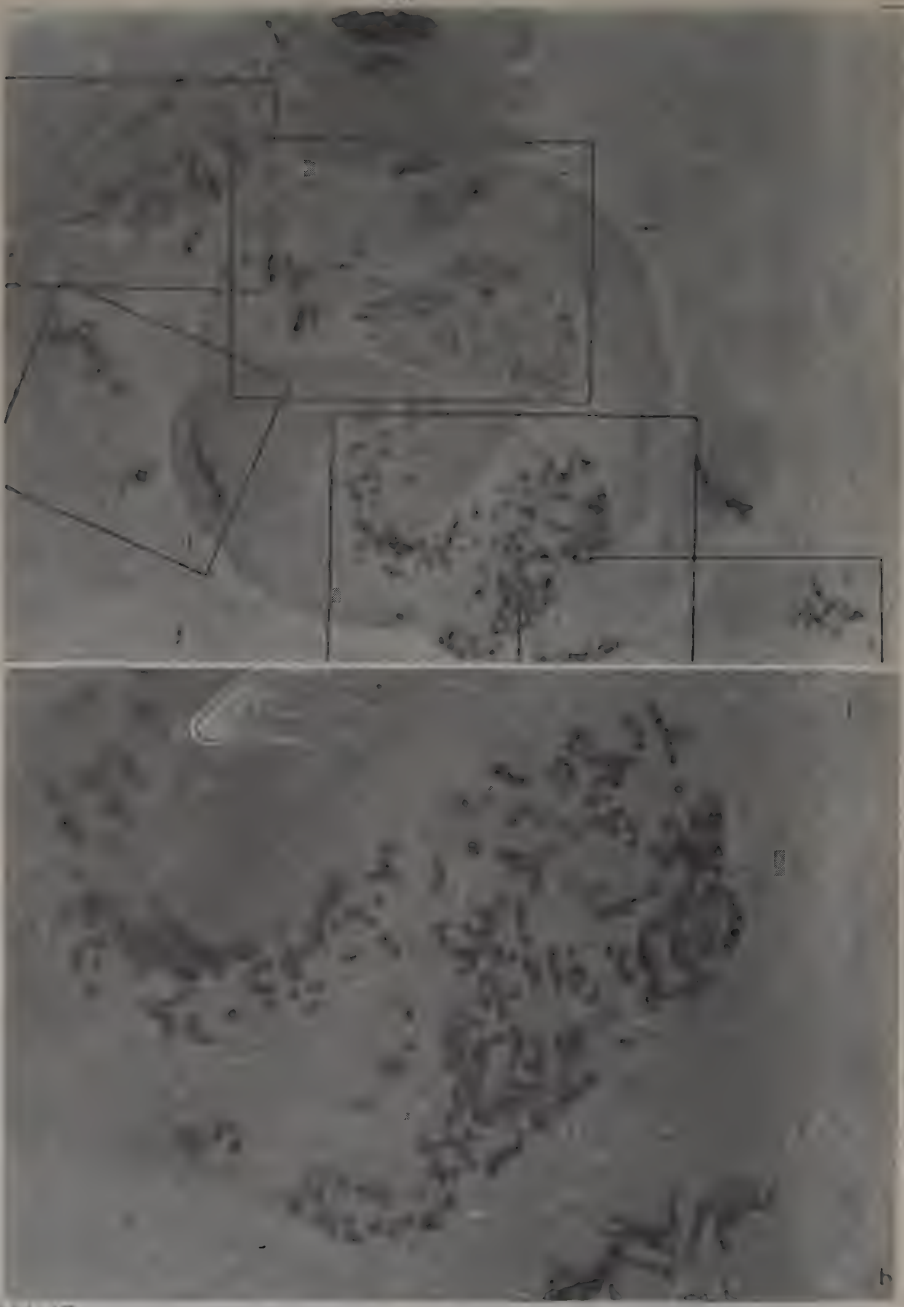


Abb 18

Abb. 15: a) Nach PEG Behandlung erhaltener zweikerniger Karottenprotoplast. b) Heterokaryont aus einem Karotten- und Tabakprotoplasten. c) Polynucleäres Fusionsprodukt aus Petunia-und Atropaprotoplasten. d und e) Aneinanderlagerung der Kerne in Atropa- / Petuniaheterokaryonten nach24 stündiger Kulturzeit.

Abb16: Mitose einer tetraploiden Petuniazelle, 3 Tage nach der PEG Behandlung der Protoplasten. a) Prophase, b) Metaphase, c) Anaphase. (4n = 28)

Abb. 17: a und b) Meta- und Anaphase eines diploiden Petuniakernes (2n = 14). c und d) Metaphasen eines tetra- bzw. diploiden Atropa Kernes (4n =144),(2n = 72). e) Anaphase eines synchron teilenden 6 kernigen Petuniahomokaryonten 5 Tage nach der PEG Behandlung. f) Asynchron teilender Heterokaryont 5 Tage nach der PEG Behandlung von Atropa- und Petuniaprotoplasten. Zwischen den enthaltenen Petuniakernen besteht Synchronie, sie befinden sich in Prophase, die beiden Atropakerne dagegen in Interphase. g) Nach der Kernfusion von Atropa- und Petuniakernen stattfindende Mitose. Der Hybridkern befindet sich im Anaphasestadium. Durch Ausbildung einer gemeinsamen Spindel liegen in den beiden Hälften auch noch nach der Trennung allotetraploide Hybridkerne vor.

Abb. 18 : a) Synchrone Metaphasen in einer aus einem Petunia-/ Atropaheterokaryonten entstanden Kolonie 7 Tage nach der PEG Behandlung. b) Vergrößerung des markierten Bereiches 1 der sich synchron teilenden Kolonie. In der Metaphase liegen innerhalb der kleinen Atropachromosomen die deutlich größeren Petuniachromosomen vor.

Abb 19 : a und b) Vergrößerungen der Ausschnitte 2 und 3 der in Abb. 18 dargestellten sich synchron teilenden Kolonie. a) Innerhalb der Atropachromosomen befinden sich nur vereinzelt Petuniachromosomen. Neben diesen sind Metaphasen reiner Petuniakerne zu beobachten. b) Neben den Atropachromosomen liegen in der gemeinsamen Metaphase der Atropa und Petuniakerne nur noch 3 Petuniachromosomen vor.

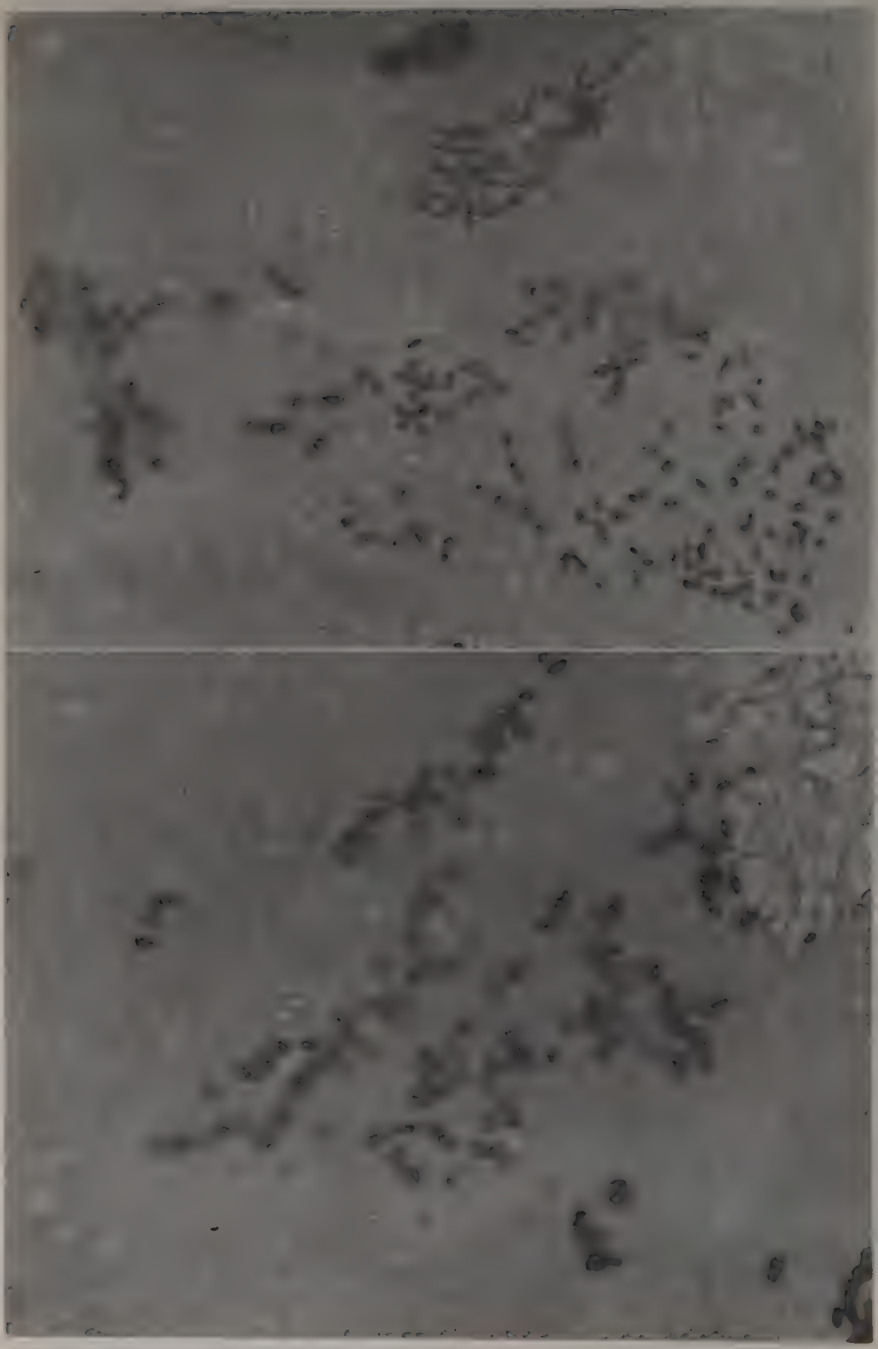


Abb.19

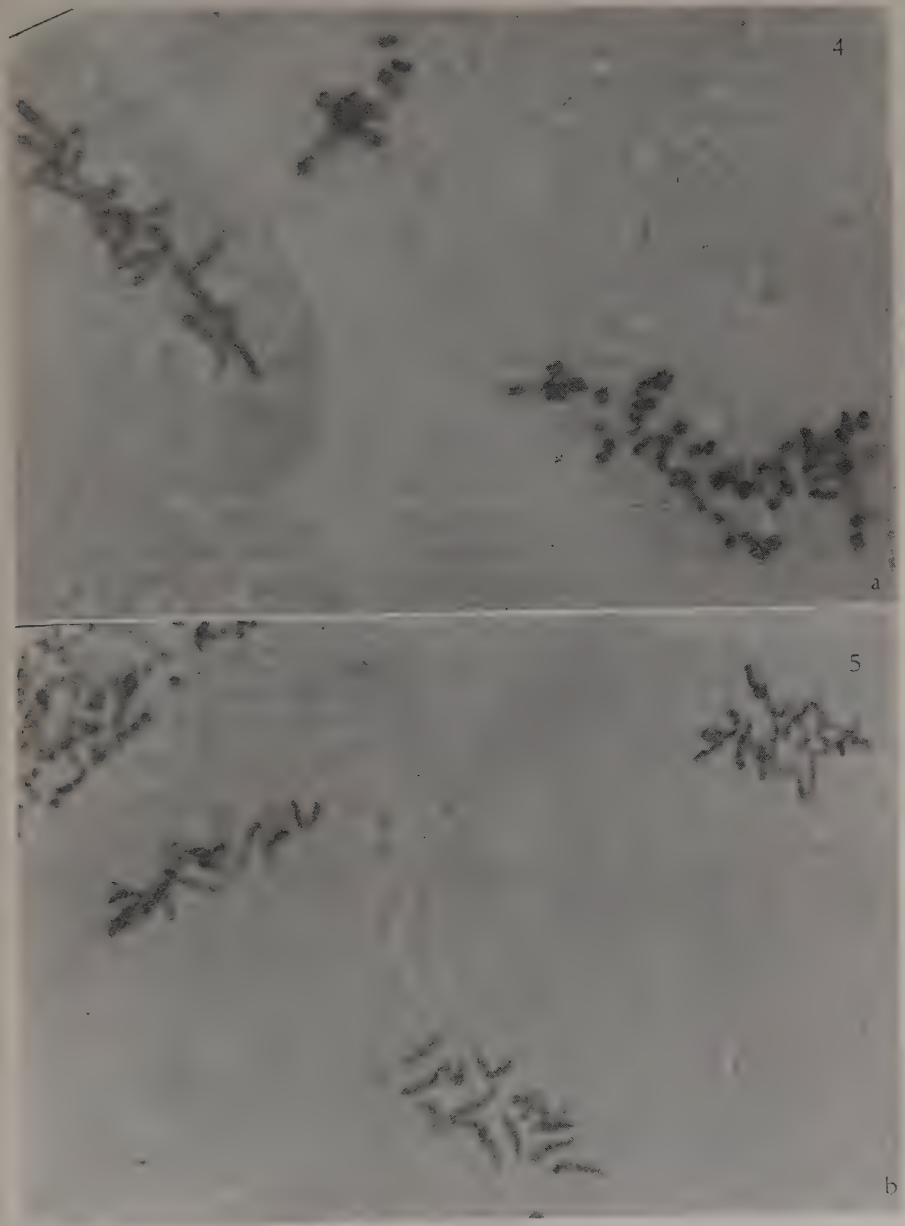


Abb. 20

und die sich darüber hinaus noch synchron teilten (Abb. 17g und 18 a und b). In einer 7 Tage alten, aus einem Petunia-Atropa Heterokaryonten gebildeten sich synchron teilender Kolonie war ein Kern zu erkennen, der innerhalb der kleinen Atropachromosomen die für Petunia spezifischen 14 größeren Chromosomen enthielt. (Abb. 18a und b). In der gleichen Kolonie lagen außerdem noch Metaphasestadien vor, die neben den Atropachromosomen nur vereinzelte Petuniachromosomen aufwiesen, und daneben Kerne, die nur Petuniachromosomen zeigten. In einer anderen Zelle war dagegen eine Anaphase mit jeweils der gleichen Anzahl vorhandener Atropa- und Petuniachromosomen zu erkennen, (Abb. 17g) was auf eine gemeinsame Spindelbildung der beiden Partnerkerne zurückzuführen war, so daß die Ausbildung echter Hybridzellen erfolgen konnte.

Abb. 20 a und b: Vergrößerungen der Ausschnitte 4 und 5 der in Abb. 18 dargestellten Kolonie. Neben den gemischten, aus Atropa-und Petuniachromosomen bestehenden Kernen liegen Metaphasestadien reiner Petuniakerne vor, welche wahrscheinlich aus einem Petuniakern der Hybridzelle hervorgegangen sind, der nicht an der Kernfusion beteiligt war.

Regeneration von Pflanzen

Die hier erzielten Versuchsergebnisse zeigen deutlich, daß die gebildeten Heterokaryonten auf Grund des phänotypischen Merkmals "Farbe" der Protoplasten, der unterschiedlichen Intensität der Kernfärbung und der Größe der Chromosomen zu erkennen waren. Eine Selektion der Heterokaryonten oder auch der eindeutig nachgewiesenen Hybridzellen war aber nicht möglich. Es wurden daher alle in der Kultur vorhandenen Kolonien aufgezogen und in den erhaltenen Kalli die Bildung von Pflanzen induziert. Insgesamt wurden bisher 76 Pflanzen regeneriert. Davon aus Fusionsansätzen zwischen Tabak und Karotte 21, Petunia und Karotte 23 und Petunia und Atropa 32. Von insgesamt 20 Pflanzen wurden bisher Phänotypus, Habitus und das Karyogramm der Wurzelspitzen untersucht. 4 Pflanzen wurden eindeutig als Petunien identifiziert. Die 21 aus Fusionsansätzen zwischen Tabak- und Karottenprotoplasten regenerierten Pflanzen zeigten phänotypische Merkmale von Tabakpflanzen. Von den 16 cytologisch untersuchten Pflanzen waren 2 polyploid, eine davon wies jedoch ein Chromosom auf, das in seiner Größe und Intensität der Färbung dem eines Karottenchromosoms entsprach. Außerdem war diese Pflanze durch einen irregulären Verlauf der Blattnerven, Verkrüppelung der Blätter und verstärkter Bildung von Nebenblättern charakterisiert.

4. DISKUSSION

Voraussetzung für die Aufzucht somatischer Hybridpflanzen ist die Erfassung von Methoden zur Isolierung von Protoplasten möglichst vieler Pflanzenspecies und die Ermittlung von Kulturbedingungen, unter denen Zellwandregeneration, Teilungen und die Regeneration ganzer Pflanzen induziert werden können. Weiterhin ist es erforderlich, Methoden zur Fusion von Protoplasten unterschiedlicher Species zu ermitteln, durch die eine möglichst hohe Anzahl fusionierter Protoplasten ohne irreversible Schäden erhalten werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurden daher zunächst Bedingungen zur Isolierung und Kultur vier verschiedener Species, nämlich Daucus carota, Atropa belladonna, Nicotiana tabacum und Petunia hybrida ermittelt, der zweite Teil der Arbeit betraf dann die Fusion dieser Protoplasten und die Kultur der gebildeten Homo- und Heterokaryonten.

Protoplasten sind bisher von fast allen Teilen der Pflanzen isoliert worden: Wurzelspitzen (Cocking 1960), Kotyledonen (Cocking 1961), Früchten (Gregory und Cocking 1965), Coleoptilen (Ruesink und Thimann 1965), Blättern (Takebe, Otsuki und Aoki 1968), Blütenblättern (Potrykus 1971), Endosperm (Motoyoshi 1971), Mikrosporen (Bhojwani und Cocking 1972; Bajaj 1973) und Zellkulturen (Schenk und Hildebrandt 1969, Keller et al. 1970, Hellmann und Reinert 1971). Jedes Material hat seine eigene Charakteristik, die eine erfolgreiche Protoplastenisolierung beeinflussen kann, und es ist daher verständlich, daß die Methoden in den einzelnen Fällen variieren. Auch in dieser Arbeit mußten unterschiedliche Methoden für die Isolierung von Protoplasten aus Zellkulturen von Daucus und Atropa einerseits und andererseits aus Blattmesophyll von Nicotiana und Petunia angewendet werden. Grundsätzlich läßt sich die Isolierung durch zwei Prozesse beschreiben, die Plasmolyse des Zellmaterials und den enzymatischen Abbau der Zellwand. Allein schon durch die Plas-

molyse werden die Lebensbedingungen und Funktionen der Zellen in starkem Maße beeinflußt (Greenway 1970). Die Gegenwart einer osmotisch aktiven Substanz ist jedoch für die Isolierung und Kultur von Protoplasten unvermeidbar. Da die Protoplasten die feste Umgrenzung der Zellwand nicht besitzen, müssen sie durch das sie umgebende Medium stabilisiert werden. Um einen osmotischen Schock für die Zellen zu vermeiden, wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zell-Suspensionen durch sehr langsame Zugabe der Sorbit oder Mannit haltigen Enzymlösung plasmolysiert. Blattmesophyll dagegen wurde direkt der Endkonzentration des Plasmolytikums ausgesetzt, dafür jedoch 1 - 2 Stunden ohne Zusatz des Enzyms gehalten. Diese Vorplasmolyse hat sich bei den hier beschriebenen Versuchen, wie auch bei Cocking (1972) und Coutts und Wood (1975) als günstig erwiesen, da so ein Zerplatzen der Protoplasten weitgehend verhindert wurde. Die Vorplasmolyse hatte bei Gewebekulturzellen keinen Einfluß auf die Lebensfähigkeit der isolierten Protoplasten. Bedeutung kommt auch der Art des Plasmolytikums zu. Cocking (1960) verwendete Saccharose, Eriksson und Jonasson (1969) Sorbit und Nagata und Takebe (1969) Mannit. Die Zuckeralkohole Sorbit und Mannit erwiesen sich für die Karotten-, Atropa- und Mesophyllprotoplasten als geeignet. Sie sind nicht toxisch und permeieren kaum. Die Verwendung anorganischer Salze als Plasmolytika wurde von Horine und Ruesink(1972) und Meyer (1974) beschrieben. Bei dem Versuch Tabakprotoplasten mit Hilfe des von Meyer und Abel (1975b) beschriebenen Salzmediums zu isolieren, konnten Protoplasten ohne Schwierigkeiten erhalten werden. Da jedoch für die Regeneration von Zellwänden und Kallus ein Kohlenhydrathaltiges Medium erforderlich war, wurde,um negative Effekte durch zu häufige Veränderung der Medienzusammensetzung zu vermeiden, ausschließlich mit Mannit und Sorbit als Osmotika gearbeitet. Die Angaben für die Konzentration des Plasmolytikums liegen zwischen 0.3 M und 0.8 M. Dabei werden im allgemeinen für die Isolierung von Mesophyllprotoplasten die höheren Konzentrationen verwendet. Nagata und Takebe (1970) setzten für die Isolierung von Tabakmesophyllprotoplasten eine 0.7 M

Mannitlösung ein. Die Isolierung von Protoplasten aus Zellkulturen wird meistens mit 0.3 M- 0.6 M Lösungen durchgeführt (Kao et al. 1971, Giles 1972, Wallin und Eriksson 1973). Höhere Konzentrationen bewirken eine bessere Stabilität des Plasmalemmas, so daß ein Zerplatzen der Protoplasten verhindert werden kann.

Für den enzymatischen Abbau der Zellwand sind Pektinasen und Cellulasen zu verwenden, die auf verschiedenartige Weise eingesetzt werden können. Die Isolierung von Protoplasten aus zuvor erhaltenen Einzelzellen wurde 1968 von Takebe et al. beschrieben. Dabei wurden durch Zusatz von Pektinase allein zunächst die Mittellamellen des Gewebes aufgelöst und Einzelzellen isoliert. Die eigentliche Zellwandauflösung erfolgte während der nachfolgenden Behandlung mit Cellulase (Zweistufenmethode). Die am häufigsten angewandte Methode zur Isolierung von Protoplasten ist jedoch die Behandlung des Gewebes mit einer Enzymmischung aus Pektinase und Cellulase,(Einstufenmethode). Die Zweistufenbehandlung ist das schonendere Verfahren. Die getrennte Anwendung der Enzyme verhindert eine mögliche Schädigung der Protoplasten durch Pektinase, da die Protoplasten selbst nur mit Cellulase in Berührung kommen. Weiterhin werden spontane Fusionen ausgeschlossen und der Isolierungsprozess kann in nur 4 Stunden abgeschlossen werden. Die hier in dieser Arbeit angewendete Methode, Mesophyllprotoplasten mit einer Enzymmischung mit geringer Enzymkonzentration zu isolieren, sieht dagegen eine Behandlungszeit von 16 Stunden vor. Mit entsprechend hohen Enzymkonzentrationen ist die Einstufenbehandlung jedoch ebenfalls innerhalb von 4 Stunden durchführbar. (Power und Cocking 1968) Die 16 stündige Inkubation hatte große zeitliche Vorteile. Da ein Wechseln des Enzyms nicht erforderlich war, konnte die Isolierung der Protoplasten über Nacht erfolgen, so daß am nächsten Tag genügend Zeit für weitere Versuche zur Verfügung stand. Die Einstufenbehandlung über Nacht war der Zweistufenmethode auch bezüglich der Ausbeute isolierter Protoplasten überlegen, da dabei auch Protoplasten aus dem Schwammparenchym freigesetzt wurden, während bei der Zweistufenmethode nur das Palisaden-

parenchym gelöst wurde.

Hauptsächlich wurden bisher in den verschiedenen Laboratorien die im Handel befindlichen Cellulasen "Cellulase Onozuka", "Meicellase", "Rhozyme" und "Driselase" und als Pektinasen "Macerozym", "Pectinol R10" und "Pektinase Sigma" verwendet. Die Reinheit, Zusammensetzung und Aktivität der einzelnen Enzyme ist verschieden, wodurch Unterschiede in den verwendeten Enzymkonzentrationen, Ausbeuten und Qualität der Protoplasten zu erklären sind.
Besondere Bedeutung sollte der Reinheit der Enzyme zukommen. Die Präparate enthalten neben den zellwandabbauenden Enzymen weitere Komponenten, wie Ribonukleasen, Lipasen und Proteasen, die Schädigungen der Protoplasten bewirken können. (Pojnar et al. 1967, Schenk und Hildebrandt 1969, Keller et al. 1970, Ruesink 1971, Kao etal.71) Um eine eventuelle Toxizität dieser Substanzen auf die Protoplasten auszuschließen, beschrieben Kao et al. 1971 eine spezielle Methode zur Reinigung der Enzyme. Diese Methode fand auch für die zu Beginn dieser Arbeit verwendete Cellulase Onozuka SS Anwendung. Die über eine Biogel P6 Säule entsalzte Cellulase besaß eine 10 fach höhere Aktivität als das Originalpräparat, so daß die Konzentration im Isolierungsmedium herabgesetzt und gleichzeitig die Inkubationsdauer verkürzt werden konnte. (Gosch, Bajaj und Reinert 1975 a)Die in späteren Versuchen ausschließlich verwendete Cellulase Onozuka R10 war ein hoch aktives, sehr reines Enzym, so daß eine Reinigung nicht erforderlich war.

Für die Isolierung von Protoplasten aus unterschiedlichen Geweben werden spezielle Enzymkonzentrationen und Kombinationen angegeben. Um Protoplasten aus Früchten von Solanum nigrum isolieren zu können, mußten Raj und Herr (1970) eine 12% ige Pektinaselösung einsetzen. 20% Pektinol R10 wurde von Gregory und Cocking(1965) für die Isolierung von Protoplasten aus Tomaten verwendet. Schenk und Hildebrandt (1971) benötigten 20 % Cellulase und 4% Macerozym für die Isolierung von Erdnußprotoplasten. Protoplasten aus Zellkulturen können in den meisten Fällen mit geringeren Enzymkonzentra-

tionen erhalten werden. Grambow et al.(1972) verwenden 1% ensalzte Cellulase, 0.5% Hemicellulase oder Pektinase, Hellmann und Reinert (1971) 5% Cellulase, Wallin et al. (1974) 2% Driselase für die Isolierung von Karottenprotoplasten. Protoplasten aus Tabaksuspensionskulturen können von Uchimiya und Murashige (1974) mit 1% Cellulase und 0.2% Macerozym isoliert werden. Für die in dieser Arbeit verwendeten Suspensionskulturen von Atropa- und Karottenzellen wurde eine Enzymmischung von 1.5% Cellulase und 0.5% Macerozym als optimal ermittelt. Mit dieser Konzentration konnten 95% der Zellen innerhalb von 4 Stunden zu Protoplasten isoliert werden. Für die Isolierung von Tabak- und Petunia-Mesophyllprotoplasten konnte die Enzymkonzentration auf Grund der langen Inkubationszeit von 16 Stunden auf 0.1% Macerozym und 0.5% Cellulase reduziert werden. Bei dieser geringen Konzentration ist die Gefahr einer Schädigung stark vermindert.Cocking et al.(1974) dagegen verwenden bei gleicher Inkubationszeit 0.25% Macerozym, 2.5% Meicellase für Petunia- bzw. 0.5% Macerozym und 5% Cellulase für Tabakprotoplasten.

Einen entscheidenden Einfluß auf die zur vollständigen Auflösung der Zellwand erforderlichen Inkubationszeit hat die Temperatur. Nach Angaben des Herstellers besitzen Macerozym und Cellulase R10 bei 40- 50°C die größte Enzymaktivität. Die Isolierung von Protoplasten in diesem Temperaturbereich würde jedoch Schädigungen der Protoplasten zur Folge haben. Der Versuch, Protoplasten von Daucus carota bei Temperaturen von 22- 36°C zu isolieren, zeigte deutlich, daß bei 36°C diese am schnellsten, in nur 3 Stunden zu erhalten waren,sie waren jedoch nur reduziert lebensfähig. Eine ähnliche Beobachtung machte Binding (1974 b). Huber und Edwards (1975) stellten fest, daß bei Temperaturerhöhung die Protoplastenausbeute proportional zunahm, bei 36°C war sie jedoch reduziert. Mit einer Isolierungstemperatur von 30- 33°C konnten in dieser Arbeit Karotten- und Atropa-Protoplasten in 5 bzw. 4.5 Stunden isoliert werden, ohne daß sie gegenüber den bei 25°C erhaltenen Protoplasten Schädigungen aufwiesen.

Für die erfolgreiche Isolierung von Protoplasten ist das Alter und der physiologische Zustand des Zellmaterials von großer Bedeutung. Der Zustand der Zellen verändert sich mit ihrem Alter (Bajaj 1974). Dabei spielt nicht nur das Alter der Zellkulturen selbst eine Rolle, sondern auch die Isolierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Übertragungsperiode kann bei dem selben Stamm zu divergierenden Ergebnissen führen (Bawa und Torrey 1971, Uchimiya und Murashige (1974). Die besten besten Ergebnisse bei der Isolierung von Karotten- und Atropaprotoplasten konnten hier erzielt werden, wenn die Zellkulturen 3 - 4 Tage nach der wöchentlichen Übertragung verwendet wurden. Um für jeden Versuchsansatz gleichartiges Material zur Verfügung zu haben, wurde daher von Kao et al. (1974) und Wallin et al.(1974) das verwendete Material jeden zweiten Tag übertragen.
Für die Isolierung von Mesophyllprotoplasten spielen neben dem Alter und Zustand der Pflanzen die Aufzuchtbedingungen eine entscheidende Rolle, (Constabel et al. 1973, Shepard und Totten 1975) und sind für jede Species genau zu definieren (Watts et al. 1974, Binding 1975). Cocking et al. (1974) verwendeten für die Isolierung von Tabakmesophyllprotoplasten 50 - 60 Tage alte Pflanzen. Ihre Angaben stimmen mit den auch in der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten überein. Kartha et al. (1974) benutzten 30 Tage alte Pflanzen als Ausgangsmaterial für Brassicamesophyllprotoplasten, Evans et al. (1972) verwendeten 21- 28 Tage alte Pflanzen zur Isolierung von Getreideprotoplasten. Versuche dieser Arbeit, Protoplasten außerhalb des optimalen Zeitraums zu isolieren, führten bei zu jungen Pflanzen zu sehr empfindlichen, leicht platzenden Protoplasten. Gleiche Beobachtungen machten Watts et al. (1974). Bei älteren Pflanzen war auf Grund der Verhärtung der Blätter die Ausbeute recht gering, und die Protoplasten waren während der Kultur wenig teilungsaktiv. Wie wichtig die Aufzuchtbedingungen der Pflanzen für den Erfolg der Protoplastenisolierung sind, konnten Constabel et al. (1973) beweisen. Sie beobachteten, daß Protoplasten nur von Pflanzen, die unter bestimmten Lichtverhältnissen aufgezogen worden waren, erhalten wurden.

Die Isolierung von Protoplasten beinhaltet nicht nur den enzymatischen Abbau von Zellwänden, sondern auch die Trennung der intakten Protoplasten von Zellen, geschädigtem und totem Material und der Enzymlösung selbst. Dabei erfordern verschiedene Materialien eine spezielle Behandlung. Aus den in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturen konnten für Atropa 80 - 90% , für Karotten 90 - 100% Protoplasten isoliert werden, so daß die Reinigung hauptsächlich auf die Entfernung des Enzyms ausgerichtet sein mußte. Die einfachste Methode war es, diese durch mehrmaliges Abzentrifugieren und Auswaschen der Protoplasten mit frischem Medium zu entfernen. In einigen Fällen wurden sie ähnlich wie bei Kao et al.(1971) auf einem Bakterienfilter (Sartorius) gewaschen. Da jedoch durch Zentrifugation der Karotten- und Atropa-Protoplasten bei 100g und der empfindlicheren Mesophyllprotoplasten bei 50g für 10 Minuten keine Schädigung zu beobachten war, wurde diese bedeutend einfachere und schnellere Methode bevorzugt. Zur Entfernung zellulärer Verunreinigungen war eine weitere Behandlung erforderlich. Ein großer Teil ungelösten Zellmaterials war durch Filtration durch eine Nylonfolie von 30 - 40um Maschenweite zu entfernen. Ebenso verfuhren auch Kameya und Uchimiya (1972), Hanke und Northcote (1974), Binding (1974) u.a. Eine andere Methode beschrieben Chupeau und Morel (1970). Sie verwendeten einen Saccharose - Sorbitgradienten. Eine Trennung mit Hilfe eines Dichtegradienten wurde auch in dieser Arbeit durchgeführt. Es wurde ein Ficoll - Sorbit Zweistufengradient verwendet, (Gosch, Bajaj und Reinert 1975 a) der eine Trennung der Protoplasten von Verunreinigungen ohne größere Verluste bewirkte. Ruesink (1971) hatte den Verlust bei der Reinigung der Protoplasten mit 50% angegeben, der sich auch in dieser Arbeit bei der Reinigung von Mesophyllprotoplasten durch Zentrifugation in 20% iger Saccharoselösung ergab.Die ursprüngliche Ausbeute von 3.10^6 Protoplasten/g Blattmaterial reduzierte sich auf $1-2.\ 10^6$ Protoplasten. Bei Atropa-Protoplasten konnte eine ausgezeichnete Trennung durch Zentrifugation in 15% iger Saccharoselösung erzielt werden, die auch Scowcroft et al. (1973) für die Reinigung von Parthenocissus " Crown gall" Protoplasten verwendeten.

Eriksson et al (1974) und Gamborg et al.(1974) berichten über Schädigungen der Protoplasten durch Saccharose, in der vorliegenden Arbeit konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Eine Reinigung ohne die Verwendung von Saccharose wurde von Kanai und Edwards (1973) beschrieben. Sie konnten mit Hilfe eines Gradienten aus Polyäthylenglykol, Dextran und Sorbit nicht nur die Protoplasten von Verunreinigungen trennen, sondern auch unterschiedliche Zelltypen fraktionieren.

Die Kultur isolierter Protoplasten ist als Sonderfall der Zell- und Gewebekultur anzusehen, da sich die Protoplasten nur durch das Fehlen der Zellwand von Einzelzellkulturen unterscheiden. Diese zellwandfreie Form ermöglicht einerseits die ungehinderte Aufnahme fremden genetischen Materials, jedoch kann dieser Vorteil nur von Nutzen sein, wenn auch die Möglichkeit besteht, Zellwandregeneration, Teilungen und Kallusbildung in Protoplasten zu induzieren.

Eine längere Kultur erfordert Sterilität des Mediums und der Zellen. Das Wachstum von Bakterien kann durch Antibiotika wie Chloramphenicol (Hess und Potrykus 1972), Gentamycin (Watts und King 1973, Raveh et al.1973) oder Penicillin (Davey et al. 1974) verhindert werden. Um jedoch eventuelle Nebenwirkungen der Antibiotika ausschließen zu können, und da diese auch nicht in jedem Fall Infektionen verhindern,(Watts und King 1973) wird im allgemeinen wie auch in dieser Arbeit eine sterile Handhabung bevorzugt. Da Zellkulturen schon unter sterilen Bedingungen gehalten werden, ist für sie keine besondere Behandlung erforderlich. Die Isolierung von Protoplasten aus verschiedenen Pflanzenorganen erfordert jedoch eine möglichst wenig schädigende Sterilisierung des Pflanzenmaterials. In dieser Arbeit wurde dazu eine kombinierte Behandlung mit 70% igem Alkohol und 6% iger Hypochloridlösung (ACE) durchgeführt.

Die Kultur von Protoplastenkann in flüssigem oder Agarmedium erfolgen. Während das flüssige Medium einen besseren Gasaustausch und Diffusion von Substanzen gestattet, kann bei der Kultur in Agarmedium die fortlaufende Entwicklung indi-

vidueller Zellen verfolgt werden. Die Technik von Bergmann (1960) wurde für die Plattierung von Protoplasten in Agarmedium von Nagata und Takebe (1971) modifiziert. Die Kultur der Protoplasten in flüssigem Medium kann auf recht unterschiedliche Weise erfolgen. In hängenden Tropfen kultivierten Kao et al. (1970) und Rajasekhar (1973). Vasil und Vasil (1973) verwendeten Mikrokammern. Die Kultur in Mikrotropfen in Plastikpetrischalen beschrieben Kao et al. (1971), Landgren und Torrey (1973), Pelcher et al. (1974) u.a. Innerhalb dieser Arbeit wurden mehrere der verschiedenen Techniken angewendet. Die Kultur in Agarmedium wurde speziell dann durchgeführt, wenn Einzelbeobachtungen erforderlich waren oder Klone aus einzelnen Protoplasten aufgezogen werden sollten. In den meisten Versuchen wurde jedoch mit flüssigem Medium gearbeitet, dabei wurde insbesondere für die Kultur von Heterokaryonten die Mikrotropfenmethode bevorzugt.

Die erste erfolgreiche Regeneration von Zellwänden konnten Pojnar et al.(1967) für Tomatenprotoplasten berichten. Die Ausbildung zellwandähnlicher Strukturen wurde später dann von Eriksson und Jonasson (1969) beschrieben. Weitere Berichte liegen auch von Nagata und Takebe(1970), Prat und Roland (1971) u.v.a. vor. Die Regeneration von Zellwänden wird in den meisten Fällen,so wie auch hier für Atropa, Karotten und Mesophyllprotoplasten nach 2 -4 Tagen beobachtet.(Miller et al 1971, Kameya und Uchimiya 1972, Potrykus und Durand 1972, Wallin und Eriksson 1973, Gosch, Bajaj und Reinert 1975). Die regenerierten Zellwände können fluoreszensmikroskopisch nach Färbung mit Calcofluor White (Nagata und Takebe 1970) aufgezeigt werden. Während durch Plasmolyse Zellwände erst nach einer gewissen Festigung nach 4-5 Tagen nachzuweisen sind, erlauben elektronenoptische Untersuchungen, wie sie von Pojnar et al. (1967), Prat und Roland (1971), Willison und Cocking (1972) und Nagata und Yamaki (1973) durchgeführt wurden, schon eine Analyse des Regenerationsprozesses selbst.Mit Hilfe cytochemischer Färbungen konnten Prat und Roland (1971) und Roland und Prat (1973) die Ausbildung fibrillärer Strukturen am Plasmalemma erkennen. Sie vermuteten, daß diese fibrillären Strukturen aus den Polysacchariden Cellulose und

Pektin bestehen. Eine Verdichtung des Partikelmusters am Plasmalemma nach 20 - 24 stündiger Kultur beobachteten Robenek und Peveling(1975), wie auch Willison und Cocking (1972 und 1975) und Grout (1975). Burgess et al. (1973) erkannten Zellwandfragmente an den frisch isolierten Protoplasten, welche sie als eventuelle Ausganspunkte für die Neusynthese von Wandmaterial ansahen. Takebe et al. (1973) konnten dagegen bei ihren Untersuchungen keine Wandreste identifizieren. Willison und Cocking (1972) kamen auf Grund ihrer Beobachtungen zu der Schlußfolgerung, daß die Zellwände im frühen Stadium eine anomale Ultrastruktur aufweisen. Die wahrscheinlich aus Cellulose bestehenden Fibrillen verdichten sich erst während einer längeren Kulturperiode. Diese Beobachtungen können im Zusammenhang mit denen von Horine und Ruesink (1972) gesehen werden, welche die regenerierte Zellwand im frühen Stadium auch nur als eine "zellwandähnliche" ansehen. Hanke und Northcote (1974) machen das Fehlen von Pektin für das anomale Erscheinungsbild und Verhalten der Zellen insbesondere für das Phänomen des "Buddings" verantwortlich.
"Budding" wurde schon von Steward et al. (1958) bei der Kultur von Zellen und dann insbesondere bei Protoplasten von Bawa und Torrey (1971), Kao et al.(1970), Constabel et al. (1973), Bogers (1973) u.a. beobachtet. Starkes "Budding" und die Ausbildung von Subprotoplasten zeigte sich innerhalb dieser Arbeit bei der Kultur von Karottenprotoplasten in Agarmedium (Abb. 3 a - f). Man kann vermuten, daß die Ausbildung dieser irregulären Formen einerseits durch den Druck des festen Agarmediums und außerdem noch durch eine ungleichmäßige Neoformation der Zellwand hervorgerufen wurden.
Es ist Voraussetzung für ein normales Teilungsverhalten der Protoplasten, daß diese zunächst eine Zellwand regenerieren. (Cocking 1972, Gamborg et al. 1973 u.a.). Normalerweise geht die Zellwandbildung bei der Zellteilung vom Phragmoplasten aus. Die Regeneration von Zellwänden um Protoplasten ist daher eine vollkommen anomale Syntheseleistung der Zelle (Takebe et al. 1973). Die hier isolierten Protoplasten von Daucus, Atropa, Nicotiana und Petunia zeigten generell Zellwand - bildung, jedoch war die Bereitschaft dazu bei den einzelnen

Protoplastentypen unterschiedlich. Die Beobachtung von Hellmann (1976), daß Zellwandregeneration nur bei Protoplasten aus jungen Kulturen von Daucus carota möglich ist, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Der hier verwendete anthocyanhaltige Stamm hatte bei den Versuchen ein Alter von 6 Jahren erreicht, und war damit dem"alten Stamm" bei Hellmann (1976) gleichzustellen. Es konnte jedoch beobachtet werden, daß nach 14 tägiger Kulturzeit von Protoplasten des anthocyanhaltigen stammes 10 - 20 % keine deutliche Zellwand gebildet hatten. Im Gegensatz dazu war der Prozentsatz nach 14 Tagen noch vorhandener Atropaprotopälsten, die aus einem 2 Jahre alten Stamm gewonnen worden waren, mit 3 - 5 % sehr gering. Man kann daher gewisse Parallelen zwischen den beiden"alten Karottenstämmen" und den jungen Karotten bzw. Atropa Stämmen ziehen, und annehmen, daß tatsächlich das Alter des Ausgangsmaterials die Fähigkeit zur Zellwandregeneration beeinflußt. Dieses wurde auch durch einen Kulturversuch mit Mesophyllprotoplasten bestätigt, die von alten, schon blühenden Pflanzen isoliert worden waren. Die Protoplasten zeigten nur geringe Lebensfähigkeit und bildeten selten Kolonien. Andererseits ist aber auch die Medienzusammensetzung von großer Bedeutung für das Verhalten von Protoplasten, und insbesondere auch für die Ausbildung der "Riesenprotoplasten" bei Hellmann (1976) verantwortlich.

Die Vielfältigkeit der in der Literatur für die Kultur von Protoplasten beschriebenen Medien deutet darauf hin, daß die einzelnen Typen recht unterschiedliche Ansprüche an die Nährstoffzusammensetzung stellen. Ein Medium speziell für die Kultur Tabakprotoplasten entwickelten Nagata und Takebe (1971). Durand et al. (1973) und Frearson et al. (1973) verwendeten bestimmte Medien für Petuniaprotoplasten. Ein modifiziertes Heller- Medium benutzten Power et al. (1975) für die Kultur von Parthenocissus Protoplasten und Chupeau und Morel (1970) für Karottenprotoplasten. Verschiedene Modifikationen des B5-Mediums(Gamborg 1968) werden für die Kultur von Soja-

bohnen- Vicia-und Hordeum-Protoplasten von Kao et al.(1974 und 1975) beschrieben. In dieser Arbeit wurde jedoch deutlich, daß die isolierten Karotten-, Atropa-, Petunia- und Tabak_Protoplasten nahezu gleichartige Bedürfnisse an das Kulturmedium stellen. Diesen Anforderungen werden sowohl das Nagata Takebe Medium (TP), als auch modifiziertes B5 Medium bei allen 4 Species gleichermaßen gerecht.

Fortgesetzte Teilungen, nach Zellwandregeneration von Protoplasten, wurden zum ersten Mal von Kao et al. (1970) und Nagata und Takebe (1970) erzielt. In der folgenden Zeit wurde die Regeneration von Kallus von Takebe et al. (1971), Potrykus und Durand (1972), Kameya und Uchimiya (1972), Grambow (1972), Maretzki und Nickell (1973), Constabel (1973), Pelcher et al. (1974), Binding (1974), Coutts und Wood (1975) Gosch et al. (1975 a und b) berichtet. Teilungen werden in den meisten Fällen 3-5 Tage nach der Isolierung der Protoplasten beobachtet. Die in dieser Arbeit kultivierten Mesophyllprotoplasten von Petunia und Tabak zeigten gegenüber den Protoplasten aus Zellkulturen schnellere Zellwandregeneration und folglich auch frühere Teilungen. Die schnellere Zellwandregeneration wurde auch von Eriksson (1970) beschrieben. Gamborg et al. (1973) begründen dieses Phänomen durch die zusätzliche Synthese von Kohlenhydraten in den Chloroplasten, welche für die Zellwandbildung ausgenutzt werden können.

Untersuchungen zur Feinstruktur während der Kultur von Protoplasten wurden von Wallin und Eriksson (1973), Pearce und Cocking (1973), Fowke et al (1973 und 1974) Grout (1975) u.a. durchgeführt. Die Ansammlung vieler aktiver Golgikörper und Endoplasmatischen Reticulums in der Nähe des Phragmoplasten ließen Fowke et al (1973) auf ihre Beteiligung bei der Zellwandregeneration schließen. Die Vermutung, daß der Isolierungsprozess eine Veränderung des Teilungsmechanismus der Zellen bewirken könne, ließ Fowke et al. (1974) neben den kultivierten Protoplasten auch die entsprechenden Zellkulturen von Sojabohnen elektronenmikroskopisch untersuchen. Sie konnten aber außer der schnelleren Ausbildung des Phragmoplasten und einer dickeren Zellplatte in den Protoplastenkulturen keine Unterschiede feststellen.

Ein Teilungsverhalten, daß nicht dem einer normalen Zellteilung entspricht, wurde von Hellmann und Reinert (1971), Bawa und Torrey (1971), Reinert und Hellmann (1973), Scowcroft et al. (1973) und Meyer und Abel (1975) mit der Ausbildung polynucleärer Protoplasten beschrieben. Während die Karyokinese wie bei einer normalen Zellteilung ablief, fand jedoch keine Cytokinese statt, wofür das Fehlen der Zellwand, bzw. die Unfähigkeit der Protoplasten, eine neue Zellwand zu synthetisieren verantwortlich zu machen ist.
Parallel zu den oben beschriebenen Beobachtungen wurde das Auftreten homokaryontischer, polynucleärer Protoplasten auch von Motoyoshi (1971), Power et al. (1971), Miller et al. (1971) Withers und Cocking (1972), Kao et al.(1973), Evans et al. (1973) u.a. beobachtet. Diese Autoren machten jedoch spontane Fusionen für die polynucleären Formen verantwortlich. Miller et al.(1971) schließen aber die Entstehung der vielkernigen Protoplasten durch Mitose nicht aus, da sie Mitosestadien nach 24 stündiger Kulturzeit beobachten konnten, ohne daß Zellwände regeneriert worden waren.

Die Teilungsaktivität von Protoplasten kann wie auch die von Zellen durch verschiedene Faktoren beeinflußt werden. Als exogene Faktoren sind die Konsistenz und Zusammensetzung des Mediums, insbesondere Zucker, Phytohormone, Ca^{++} und Mg^{++} Ionen, als auch Konditionierung, pH Wert des Mediums, Licht, Temperatur und Zelldichte im Medium zu nennen. Außerdem spielen endogene Faktoren, wie Alter und physiologischer Zustand als auch die Aufzuchtbedingungen des Pflanzenmaterials eine bedeutende Rolle. Alle diese Faktoren sollen im Folgenden diskutiert werden.

Beim Vergleich des Verhaltens von Protoplasten in Agar- und flüssigem Medium, konnten für Atropa- und Karottenprotoplasten Unterschiede festgestellt werden. Auf das Verhalten von Mesophyllprotoplasten hatte die Konsistenz des Mediums keinen Einfluß. Wie schon erwähnt, wurde bei Karottenprotoplasten, die in Agar plattiert waren, starkes 'Budding' beobachtet. Protoplasten, die diese anomalen Formen bildeten, teilten sich nur ganz selten. Eine Hemmung der Teilungsaktivität von Protoplasten, die Buddingformen zeigten, beschrieben auch Nagata und Ta-

kebe (1970) und Michayluk und Kao (1975). Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit beobachteten Effekt des Agarmediums, stellten Ohyama und Nitsch (1972) fest, daß gerade Agarmedium die Bildung von Subprotoplasten verhinderte. Die Plattierung von Atropa-Protoplasten führte zum Absterben der Mehrzahl der Protoplasten, und die verbleibende geringe Anzahl Lebender ermöglichte auf Grund der geringen Zelldichte keine erfolgreiche Kultur. Atropa-Protoplasten wurden daher in allen Versuchen ausschließlich in flüssigem Medium kultiviert. Die Ursache für ihr Verhalten in Agarmedium wurde nicht untersucht.

Die ersten fortgesetzten Teilungen von Protoplasten waren von Kao et al. (1970) bei der Kultur in konditioniertem Medium erzielt worden. Wie schon die Versuche von Stuart und Street (1969) gezeigt hatten, konnte bei Kulturen mit geringer Zelldichte eine Stimulierung der Zellproliferation durch die Verwendung von konditioniertem Medium erreicht werden. Die von den Zellen metabolisierten, konditionierenden Faktoren sind vermutlich Phytohormone, Aminosäuren und Kohlenhydrate,(Earle und Torrey1965, Maretzki et al. 1974 u.a.) und begünstigen ebenso wie Ammen- (Gibbs und Dougall 1965) oder "Feederzellen" (Raveh et al. 1973 und 1975) und"Reibsaft" (Potrykus und Durand 1972) das Zellwachstum, so daß eine Kultur mit geringer Zelldichte ohne Degeneration möglich ist. Ein Nachteil ist jedoch die geringe Definierbarkeit der Menge und Art der wirksamen Faktoren. Bei der Verwendung nicht konditionierten Mediums diffundieren die von den Zellen metabolisierten Substanzen bis zum Konzentrationsausgleich in das Medium. Durch die wenigen vorhandenen Zellen erniedrigt sich die Konzentration der Substanzen in den Zellen selbst dermaßen, daß sie nicht mehr lebensfähig sind. Es bestehen also sehr enge Zusammenhänge zwischen Zelldichte und Konditionierung des Mediums, so daß es auch Kao et al.(1971) allein durch Erhöhung der Protoplastenzahl pro ml Medium gelang, das konditionierte Medium gegen ein vollsynthetisches, definierbares zu ersetzen.
Um die Kultur von Protoplasten in geringer Dichte ermöglichen zu können, entwickelten Kao und Michayluk (1975) ein definiertes Medium, in dem Aminosäuren, Zucker,Zuckeralkohole, organische Säuren und verschiedene Vitamine in einer Konzentration

enthalten sind, die eine Diffusion der in der Zelle metabolisierten Substanzen verhindert. Bei diesen Versuchen zeigte sich, daß Kokosnußmilch und Caseinhydrolysat einen gleichermaßen konditionierenden Effekt haben, und ihr Zusatz zu dem mit den oben beschriebenen Substanzen angereicherten Medium ermöglichte sogar die Kultur einzelner Protoplasten. Ein Problem besteht jedoch auch hier wieder durch die Verwendung eines undefinierten Mediums.

Ein kritischer Bestandteil des Mediums ist Saccharose. Sie wurde häufig für das"Budding"von Protoplasten verantwortlich gemacht.(Horine und Ruesink 1972, Nagata und Takebe 1970, Kao und Michayluk 1974). Schädigende Effekte der Saccharose wurden auch von Gamborg et al(1973 und 1975) beschrieben, sie empfahlen daher die Verwendung von Glukose. Für die Beurteilung des Einflusses von Glukose und Saccharose wurden Karottenprotoplasten jeweils in B5- und MS Medium kultiviert, und die Anzahl toter, zellwandregenerierender und teilungsfähiger Protoplasten bestimmt. In beiden Medien konnten bezüglich der Saccharose und Glukose keine Unterschiede im Verhalten der Protoplasten festgestellt werden. Sowohl im saccharose-als auch glukosehaltigen Medium wurde überdies hinaus"Budding"beobachtet, so daß für dieses Phänomen offensichtlich andere Faktoren verantwortlich sind.
Der Vergleich der Effizienz von B5-und MS Medium zeigte deutliche Unterschiede in der Lebensfähigkeit und im Teilungsverhalten der Karottenprotoplasten während der ersten Kulturwoche. Da die Protoplasten bei diesem Versuch in einem Arbeitsgang isoliert, und nur zur Kultur in die verschiedenen Medien gebracht wurden, ist die Ursache des Vitalitätsunterschiedes in den Medien selbst zu suchen. Die Zellkulturen waren vor der Protoplastenisolierung in flüssigem MS- Medium kultiviert worden und hatten sich über eine lange Kulturzeit an das Medium gewöhnt. Die veränderten Umstände durch den Isolierungsprozess einerseits und andererseits additiv die Veränderung der Mediumszusammensetzung muß daher diesen hohen Anteil toter Protoplasten im B5- Medium bewirkt haben. Diese Erklärung wird auch durch die Gleichwertigkeit der beiden Medien in Bezug auf die Teilungsaktivität der Protopalsten bestätigt. Nach 14 tägiger

Kulturzeit hatten sich die Protoplasten auch an das B5 Medium gewöhnt, und zeigten die gleiche Anzahl mindestens einmal geteilter Zellen. (41% in B5- und 40% in MS Medium). Bei der Kultur der Karottenprotoplasten in Nagata Takebe Medium (TP) konnten keine Unterschiede zum MS Medium festgestellt werden. Dieses Medium unterscheidet sich vom MS Medium nur durch andere Konzentrationen der enthaltenen Salze, während im B5 Medium die Komponenten selbst variieren.

Ebenso wie bei der Isolierung kann die Art und Konzentration des Plasmolytikums auch das Verhalten der Protoplasten während der Kultur entscheidend beeinflussen. Da auf die Verwendung von Saccharose im Medium schon näher eingegangen worden ist, sollen an dieser Stelle nur Sorbit, Mannit, Glukose und Xylose noch erwähnt werden. Grambow et al.(1972) und Gamborg et al. (1975) erzielten bessere Kallusbildung wenn sie Glukose anstatt Sorbit oder Mannit verwendeten. Der Vorteil der Verwendung von Glukose ist, daß sie von den Zellen direkt verbraucht wird, und sich der Plasmolytikumsgehalt des Mediums selbst reduziert, was sich günstig auf die Teilungsaktivität der Zellen auswirkt. Die am häufigsten und auch hier verwendeten Osmotika sind Sorbit und Mannit. Diese Substanzen sind inert. Eine Toxizität konnte weder in dieser noch in anderen Arbeiten festgestellt werden. Ein kritischer Punkt ist jedoch die Konzentration dieser Substanzen im Kulturmedium. Bei hoher Plasmolytikumskonzentration stellten Schenk und Hildebrandt (1969) verminderte Cytoplasmaströmung fest. Binding (1974 b) beobachtete, daß die erste Mitose der Protoplasten bei hohen Plasmolytikumskonzentrationen verzögert ist. Wallin und Eriksson (1973) stellten eine Wachstumshemmung der aus Karottenprotoplasten regenerierten Zellen fest, wenn die Konzentration des Sorbits höher als 0.3M war. Der in dieser Arbeit durchgeführte Versuch, Karottenprotoplasten in Medium mit 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7M Sorbitgehalt zu kultivieren, zeigte deutlich, daß die Teilungsaktivität der Zellen mit steigender Sorbitkonzentration abnahm. Die gleiche Beobachtung machte auch Hellmann (1976) bei der Kultur von Zellen auf sorbithaltigem Medium. Anders als bei Wallin und Eriksson (1973) hatte das 0.3M Medium hier starkes Platzen der Protoplasten zur Folge, so daß 0.4 und 0.5 M Medium als

optimal ermittelt wurde. Nach zunächst großer Teilungsaktivität der regenerierten Atropa- und Karottenzellen auf diesen Medien wurde jedoch nach etwa 4 Wochen ein Wachstumsstillstand beobachtet. Die Teilungsaktivität wurde erst durch Erniedrigung der Osmotikumskonzentration durch Verdünnen mit sorbitfreiem, oder Übertragung auf 0.2M Agarmedium wieder angeregt.

Das Kulturverhalten undifferenzierter Zellen wird durch Phytohormone gesteuert. (Reinert 1973). Gleichermaßen sind diese für die Kultur von Protoplasten erforderlich. Kao et al.(1970) und Grambow et al. (1972) konnten Teilungen von Protoplasten, die aus Zellkulturen isoliert worden waren, in einem Medium induzieren, das nur 2.4D als Auxin enthielt. Es war auch in dieser Arbeit möglich, aus Zellkulturen von Daucus carota isolierte Protoplasten in MS Medium nur mit 2.4D als Wachstumsregulator erfolgreich zu kultivieren. Eine Kultur ohne exogenes Auxin war selbst bei Verwendung habituierter Karottenzellen als Material für die Isolierung und Kultur von Protoplasten nicht möglich. Ohne Zusatz von 2.4D waren generell nur sehr wenige der Protoplasten aus habituierten Zellen lebensfähig. Sie bildeten zwar zum Teil Zellwände, Teilungen wurden jedoch nicht beobachtet. Die gleiche Erfahrung machten auch Uchimiya und Murashige (1976) bei der Kultur von Tabakprotoplasten in auxinfreiem Medium. Selbst die Kultur von Protoplasten aus auxinautotrophen "Crown gall" Tumor Zellen erforderten zunächst den Zusatz von Auxin (Scowcroft et al.1973).Erst nach Regeneration von Zellwänden und kleinen Kolonien war exogenes Auxin nicht mehr erforderlich. Scowcroft et al. (1973) äußerten daher die Vermutung, daß zwischen der Biosynthese von Phytohormonen und der Zellwand eine Beziehung bestehen muß. Uchimiya und Murashige(1976) führten Versuche zum Vergleich der Auxine, 2.4D, NAA und IES und der Cytokoinine BAP und Kinetin mit Tabakprotoplasten durch, und stellten fest, daß NAA und Kinetin den übrigen Substanzen überlegen waren. NAA erwies sich in dieser Arbeit für die Kultur aller vier bearbeiteten Protoplastensysteme als geeeignet. Die Kultur von Atropa-Protoplasten in Medium mit NAA-Konzentrationen von 0.2- 2mg/l zeigte kein spezielles Optimum nach 14 tägiger Kulturzeit.

In vielen Arbeiten werden dem Medium Ca^{++} Ionen zur Stabilisierung der Protoplastenmembranen und zur Erhöhung der Teilungsaktivität zugesetzt. (Pelcher et al. 1974, Kao et al. 1973, Bright und Northcote 1975, Gamborg et al. 1975 und Coutts und Wood 1975). Ähnliche Wirkung wie Ca^{++} Ionen haben auch Mg^{++} Ionen, Meyer und Abel(1975) stellten jedoch bei hoher Mg^{++} Konzentration eine gewisse Toxizität dieser Ionen auf die Protoplasten fest. Die Erhöhung des Ca^{++} Gehaltes im MS-Medium bei der Kultur von Karottenprotoplasten bewirkte hier keine Stabilisierung. Ebensowenig wurde 'Budding' verhindert, noch die Anzahl teilungsfähiger Zellen erhöht. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Constabel et al. (1973) überein. Auch sie konnten nach Zusatz von Ca^{++} keinen Unterschied im Verhalten der Protoplasten feststellen.

Für die Kultur von Mesophyllprotoplasten hat die Intensität des Lichtes einen bedeutenden Einfluß. Die Chloroplasten der Mesophyllprotoplasten sind photosynthetisch aktiv und es besteht daher eine direkte Abhängigkeit zwischen der Bildung von Polysacchariden, die für die Regeneration von Zellwänden und die Zellproliferation benötigt werden, und den Lichtverhältnissen während der Kultur. Nagata und Takebe (1971) ermittelten für die Kultur von Tabakprotoplasten die Bestrahlung mit 2300 lux als optimal. Sie stellten fest, daß Licht von 700 lux die "Plating Efficieny " verringerte, höhere Intensität (5000 lux) bewirkte keine Steigerung. In dieser Arbeit wurde beobachtet, daß die Mesophyllprotoplasten von Tabak und Petunia direkt nach der Isolierung sehr empfindlich auf die relativ hohe Beleuchtungsintensität von 2300 lux reagierten, und diese zum Teil sogar letal wirkte. Die Protoplasten wurden daher für 16 Stunden nach der Isolierung im Dunkeln verwahrt, dann für 48 Stunden bei 500 lux kultiviert und erst darauffolgend bei 2300 lux gehalten. Ähnliche Kulturbedingungen ermittelte auch Enzmann Becker (1973) als optimal. Sie konnte die besten Ergebnisse erzielen, wenn sie Tabakprotoplasten zunächst bei geringer Lichtintensität von 400 lux und nachfolgend dann bei 3000 lux kultivierte.
Die hier isolierten, photosynthetisch inaktiven Daucus-und Atropa-Protoplasten, die normalerweise im Dunkeln kultiviert

wurden, zeigten bei den hier beschriebenen Bedingungen unverminderte Teilungsaktivität, so daß diese sich auch für die Kultur von Heterokaryonten aus Tabak, Petunia, Karotten-und Atropa-Protoplasten eigneten.

Ein weiterer exogener Faktor, der die Kultur von Protoplasten beeinflußt, ist die Protoplastendichte im Medium. Ein Einfluß der Zelldichte auf die Teilungsaktivität und Vitalität wurde schon von Reinert und v. Ardenne (1964), Blakely und Steward (1964), Gibbs und Dougall(1965) erkannt. In dieser Arbeit erwies sich für die Kultur von Karottenprotoplasten eine Dichte von 10^5 Protoplasten pro ml Medium als optimal. Kameya und Uchimiya (1972) , Grambow et al. (1972) konnten Karottenprotoplasten bei dieser Dichte ebenfalls erfolgreich kultivieren. Tabak- und Petunia Protoplasten wurden in dieser Arbeit, wie auch in der Literatur beschrieben mit geringerer Dichte kultiviert.($1o^3$ bis 10^4 Protoplasten/ ml). Bei dem Versuch Atropaprotoplasten mit unterschiedlichen Dichten zu kultivieren, wurde der Bereich von 6.10^4 bis 1.10^5 Protoplasten als optimal ermittelt. Die Kriterien, die zur Beurteilung der optimalen Dichte herangezogen wurden, waren wie bei Nagata und Takebe (1971) ,die Anzahl koloniebildender Zellen ("Plating Efficiency") , Untersuchungen über die Lebensfähigkeit, Zellwandregenerations- und Teilungsfähigkeit während der ersten Kulturwoche ergänzten diese Bestimmungen. Der Einfluß der Dichte ist auf eine Konditionierung des Mediums durch die darin enthaltenen Zellen zurückzuführen. (Reinert und v. Ardenne 1964). Die konditionierenden Faktoren haben aber nur bis zu einer bestimmten Konzentration einen positivien Effekt. Die Kultur von 2.10^5 Atropaprotoplasten pro ml Medium zeigte eine deutliche Wachstumshemmung, die nur durch eine Überkonditionierung des Mediums bedingt sein konnte.

Ebenso, wie das Alter und der physiologische Zustand des Pflanzenmaterials für die Isolierung von großer Bedeutung sind, spielen diese als endogene Faktoren auch für die Kultur und Regenerationsfähigkeit von Protoplasten eine bedeutende Rolle. (Gamborg et al.1975). In dieser Arbeit mit Protoplasten von Daucus und Atropa, brachten diejenigen aus sich aktiv teilen-

den Kulturen bedeutend bessere Ergebnisse, als die aus weniger teilungsaktiven Zellen. So wurden als Material auch Suspensionskulturen den Kalluskulturen vorgezogen, da diese eine bessere Proliferation aufwiesen. Auch relativ junge Kulturen, die noch starke morphogenetische Kapazität besaßen, zeigten in der Protoplastenkultur geringere Teilungsaktivität als über 2 Jahre alte, die nicht mehr spontan differenzierten (Reinert et al. 1970), dafür jedoch teilungsaktiver waren. Diese Beobachtungen wurden noch dadurch ergänzt, daß diejenigen Protoplasten, die in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellkultur, am 3-4. Tag der Übertragungsperiode isoliert wurden, in der Kultur ebenfalls die größte Aktivität aufwiesen.

Bei der Kultur von Mesophyllprotoplasten sind noch die Aufzuchtbedingungen der Pflanzen zu beachten. Pelcher et al. 1974 und Shepard und Totten sind sogar der Ansicht, daß die Aufzuchtbedingungen für eine erfolgreiche Isolierung und Kultur entscheidender sind als das Alter der Pflanzen. In dieser Arbeit wurden Tabakprotoplasten von 58 bis 72 Tage alten Pflanzen isoliert und kultiviert, ohne daß Unterschiede im Verhalten zu beobachten waren. Von blühenden Pflanzen isolierte Protoplasten zeigten nur ganz geringe Teilungsfähigkeit, wodurch der Einfluß des Alters neben den Aufzuchtbedingungen deutlich wird. In wie weit die Aufzuchtbedingungen eine Rolle spielen, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Sie waren in allen Versuchsansätzen konstant. Eine genaue Analyse der Faktoren der Aufzucht in Relation zur Protoplastenkultur könnte jedoch die Ursache häufig beobachteter Qualitätsunterschiede der Protoplasten aufklären helfen.

Aus Protoplasten regenerierte Zellen besitzen gleiche morphogenetische Eigenschaften, wie die Zellen, aus denen sie isoliert wurden. (Gamborg 1973). Bisher sind jedoch nur wenige Species bekannt, bei denen aus isolierten Protoplasten ganze Pflanzen aufgezogen werden konnten. Takebe et al.(1971) konnten als erste nach häufiger Veränderung der Zusammensetzung des Nährmediums die Regeneration von Tabakpflanzen aus Mesophyllprotoplasten induzieren. Die Bildung von Embryonen, aus denen nachfolgend Karottenpflanzen aufgezogen werden konnten, gelang Gram-

bow et al. und Kameya et al. (1972). Auch in der vorliegenden Arbeit gelang es,über Embryogenese ganze Pflanzen aus isolierten Karottenprotoplasten aufzuziehen. (Gosch, Bajaj und Reinert 1975 a). Weitere Regeneration von Pflanzen bzw. Embryonen wurden von Donn et al. (1973) und Frearson et al. (1973) für Petunia, von Bui- Dang - Ha und Mackenzie (1973) für Asparagus, von Kartha et al. (1974) für Brassica und von Vardi et al. (1975) für Citrus beschrieben. In dieser Arbeit gelang weiterhin die Induktion der Embryogenese in regenerierten Atropazellen und nachfolgende Aufzucht intakter Pflanzen. (Gosch, Bajaj und Reinert 1975 b).

Die Induktion der Embryogenese, die in der vorliegenden Arbeit für Karotten- und Atropakulturen möglich war, gelang durch Entzug des Auxins. Die aus Tabak- und Petuniaprotoplasten regenerierten Kalli konnten dagegen nur durch ein spezielles Verhältnis zwischen Auxin und Cytokinin (Skoog und Miller 1957) zur Regeneration von Sprossen gebracht werden. Während sowohl 50% der haploiden als auch diploiden Tabakkalli nach der Übertragung auf ein Medium mit 4 mg/l IES und 2 mg/l Kinetin nach 4 Wochen Sprosse gebildet hatten, zeigten Petuniakolonien auf diesem Medium nur eine verstärkte Chlorophyllsynthese. Solches Verhalten der Kolonien hatten auch Donn et al.(1973) vor dem Auftreten von Sprossen beobachtet, in der vorliegenden Arbeit wurden nachfolgend jedoch nur Wurzeln gebildet. Eine verstärkte Chlorophyllsynthese mit nachfolgender Regeneration von Wurzeln hatte auch Messerschmidt (1974) für Protoplasten aus Pharbitis nil beschrieben. Durch Variation des Verhältnisses von Auxin und Cytokinin im Medium wurde versucht, auch in den Petuniakalli die Regeneration von Sprossen zu induzieren. Dabei wurde festgestellt, daß auf einem Medium das nur Cytokinin (0.5 mg/l) enthielt, die Bereitschaft der Kalli Sprosse zu bilden,am größten war. In Medien, die mehr als 0.1 mg/l NAA enthielten, wurden nur sehr selten Sprosse regeneriert. Es war dagegen verstärktes Kalluswachstum und Wurzelbildung zu beobachten. Auf dem NAA freien Medium war das Kalluswachstum fast völlig gehemmt, einige der Kalli verkümmerten sehr schnell, so daß auch der Anteil differnzierender Kalli mit nur 15% gegenüber 50% bei Tabak verständlich wird.

Der zuvor schon erwähnten erfolgreichen Regeneration haploider Pflanzen sollte ganz besondere Bedeutung beigemessen werden. Die Produktion haploider Tabakpflanzen mit Hilfe der Antheren- oder Mikrosporenkultur stellt heute keine Schwierigkeit mehr dar. Bisher war es jedoch nicht möglich, eine optimale Vermehrung haploider Zellen durch die Zellkultur durchzuführen, da diese genetisch sehr instabil sind. Diese Arbeit macht deutlich, daß durch Klonen aus Blättern haploider Pflanzen isolierter Protoplasten Endoploidisierung verhindert wurde, so daß in 50% der regenerierten Pflanzen die Haploidie erhalten geblieben war.

Die Isolierung und Kultur von Protoplasten aus haploiden Pflanzen war schon früher von Ohyama und Nitsch (1972), Bajaj (1972) Binding (1974), Gleba et al. (1974) und Schieder (1975) beschrieben worden. Während Ohyama und Nitsch und Gleba et al. nur die Regeneration von Pflanzen aus haploiden Protoplasten berichteten, jedoch keine Aussage über die Anzahl regenerierter haploider Pflanzen machten, konnten Bajaj (1972), Binding (1974) und Schieder (1975) durch Chromosomenzählungen nachweisen, daß tatsächlich haploide Pflanzen regeneriert worden waren. Schieder erhielt aus den von Protoplasten gebildeten Kolonien 50% haploide Datura Pflanzen. Dieser Prozentsatz stimmt nahezu mit den in dieser Arbeit für Tabak ermittelten 47% überein. Haploide Pflanzen stellen für die Züchtung und Genetik ein sehr interessantes Material dar. Sie bieten im Gegensatz zu den diploiden den Vorteil, daß ein bestimmtes Merkmal durch nur ein Allel bestimmt wird. Rezessivität und Dominanz treten daher nicht auf. Protoplasten von haploiden Pflanzen sind von zumindest ebenso großer Bedeutung. Durch sie besteht die Möglichkeit, nach mutagener Behandlung direkt Pflanzen mit rezessiven Merkmalen zu isolieren. Weiterhin können durch die Fusion haploider somatischer Protoplasten diploide Hybride gewonnen werden, die gegenüber tetraploiden in vielen Fällen Vorteile bieten (Melchers 1974, Schieder 1974 und 1975).

Das Phänomen der Fusion wurde schon 1909 von Küster beschrieben. Er konnte plasmolysierte Zwiebelsubprotoplasten durch Deplasmolyse mit $NaNO_3$ Lösung fusionieren. 1937 gelang es Michel mit mechanischen Methoden, Protoplasten unterschiedlicher Species zu fusionieren. Die in der folgenden Zeit erarbeitete Möglichkeit, Protoplasten verschiedener Species in großen Mengen auf enzymatischem Wege zu isolieren, (Cocking 1960, 1961) war eine weitere wichtige Basis für die auf der Konferenz in Como (1969) von 10 Pflanzenphysiologen geäußerten Vermutung, daß es möglich sein müßte, über die Fusion somatischer Protoplasten Hybriden weit entfernt verwandter Species zu erzeugen, die durch sexuelle Kreuzung nicht denkbar wären. (Nickell und Torrey 1969). Die im ersten Teil dieser Arbeit beschriebene Isolierung und Kultur von Protoplasten bis zur Regeneration ganzer Pflanzen, ist eine weitere wichtige Voraussetzung für die eventuelle Aufzucht solcher somatischen Hybriden. (Nickell und Torrey 1969). Eine weitere Bedingung ist, daß Protoplasten unter reproduzierbaren Bedingungen fusioniert werden können, was das Thema des zweiten Teils der Arbeit war.

Unkontrollierbare, spontane Fusionen wurden von Küster (1909), Motoyoshi(1971), Power et al (1971) Miller et al.(1971), und Withers (1973) u.a. beschrieben. Diese, insbesondere während der Isolierung der Protoplasten stattfindenden spontanen Fusionen werden durch verschiedene Faktoren begünstigt. Evans et al. (1973) nahmen an, daß besonders plasmareiche Protoplasten für Fusionen prädestiniert sind. Usui und Maeda (1974), beobachteten, daß Protoplasten aus jungem Zellmaterial häufiger spontane Fusionen eingehen, als Protoplasten aus älterem Gewebe. Weiterhin ist auch der Grad der Zellaggregation des Ausgangsmaterials für die Bildung spontaner Fusionskörper verantwortlich zu machen. (Wallin und Eriksson 1973). Bei der enzymatischen Auflösung der Zellwand können eng zusammenhängende Zellen über die Ausdehnung der Plasmodesmata fusionieren.(Cocking 1970). In dieser Arbeit konnten spontane Fusionen besonders bei der Isolierung von Atropa Protoplasten beobachtet werden. Die Atropa Zellkultur bestand zum Teil aus relativ dichten Zellaggregaten plasmareicher Zellen und war daher

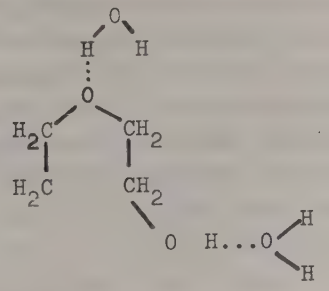
für die Bildung spontaner Fusionskörper prädestiniert. Bei der Karottenzellkultur verhinderte vermutlich der hohe Vakuolisierungsgrad, bei Meophyllprotoplasten die 2 stündige Vorplasmolyse spontane Fusionen.
Da diese Art von Fusionen nur zwischen intraspezifischen Zellen möglich sind, ist es erforderlich, für Protoplasten unterschiedlicher Species Methoden zur Induktion der Fusion zu ermitteln. Michel (1937) und Schenk und Hildebrandt (1971) versuchten, die Protoplasten durch mechanische Methoden in Mikrokapillaren und Mikromanipulatoren zu fusionieren. Durch Seewasser induzierte Fusionen wurden von Hofmeister (1954), Binding (1966) und Eriksson (1971) beschrieben. Schon Küster (1909) hatte die fusionsfördernde Wirkung von Na NO_3 erkannt, und 1970 gelang es Power et al. mit einer Saccharose- $NaNO_3$-Lösung, enzymatisch isolierte Protoplasten unterschiedlicher Species zu agglutinieren und nachfolgend zu fusionieren. Die durch $NaNO_3$ induzierte Fusion beruht vermutlich auf einer partiellen Ladungsänderung der negativ geladenen Plasmalemmaoberfläche durch die vorhandenen Na^+- Ionen, so daß es an einigen Stellen zur Agglutination kommen kann.

Eine fusionsfördernde Wirkung von Ca^{++} Ionen auf Hühner-Erythrocyten, die in einer mit Glycin/NaOH bei pH 10.5 gepufferten Lösung suspendiert waren, stellten Toister und Loyter(1971) fest. Eine ähnliche Methode wurde von Keller und Melchers (1973) für die Fusion von Mesophyllprotoplasten erarbeitet.
Bei der Behandlung von Tabakprotoplasten mit $CaCl_2$ in Glycin/NaOH-Lösung(pH 10.5) bei 37°C gelang es ihnen, 20-50% der Protoplasten an einem "Fusionsereignis "zu beteiligen. In dieser Arbeit konnten mit dieser Methode 5.5% tatsächlich fusionierter,mehrkerniger Protoplasten erzielt werden. Es wurde jedoch festgestellt,daß diese Methode die Protoplasten stark beschädigte. Die gleiche Beobachtung machte auch Binding (1974 a). Er empfahl die Verwendung von $CaNO_3$ statt $CaCl_2$ und konnte so eine Verbesserung der Lebensfähigkeit der Protoplasten erreichen. In allen oben erwähnten Arbeiten wurde deutlich, daß eine Temperaturerhöhung auf 37°C eine fusionsfördernde Wirkung hatte.

Die bisher beste Methode zur Fusion von Protoplasten wurde etwa gleichzeitig von Kao und Michayluk (1974) und Wallin et al. (1974) beschrieben. Sie verwendeten Polyäthylenglykol (PEG) des Molekulargewichtes 1500 bis 6000 in einer 50-56% igen Lösung und konnten starke Agglutinationen über große Flächen des Plasmalemmas und einen hohen Prozentsatz fusionierter Zellen erzielen. Der Vergleich der Effizienz verschiedener Fusionsmittel in dieser Arbeit, zeigte eine deutliche Überlegenheit der PEG Methode gegenüber $NaNO_3$ und $CaCl_2$-pH 10.5. Während mit $NaNO_3$ nur 1.5% und mit $CaCl_2$ 5.5% fusionierter Zellen erzielt wurden, konnten durch PEG 17% der Protoplasten zur Fusion gebracht werden.
Mit der Verwendung von Gelatine (Kameya 1973), Concanavalin A (Glimelius et al 1974) und der Anwendung immunologischer Methoden (Hartmann et al 1973) sind in der Literatur noch weitere Methoden beschrieben worden, mit denen zwar Agglutinationen, jedoch nur sehr geringe Fusionsraten erzielt werden konnten. In dieser Arbeit stand daher die Ermittlung von Bedingungen für die Fusion der Karotten- Atropa- Tabak- und Petunia-Protoplasten mit PEG im Vordergrund, unter denen eine möglichst hohe Anzahl fusionierter Protoplasten ohne irreversible Schädigung erhalten werden konnte. Dazu wurden verschiedene Faktoren der Behandlung untersucht.

Die ersten Versuche zeigten, daß Protoplasten aus Suspensionskulturen, von Daucus und Atropa einerseits und aus Mesophyll von Nicotiana und Petunia andererseits unterschiedlich empfindlich gegenüber der PEG Lösung waren. Die Protoplasten aus dem Mesophyll zeigten eine deutlich stärkere Sensitivität. Auch Kartha et al.(1974) stellten fest, daß Brassica-Mesophyllprotoplasten stärker durch das PEG geschädigt wurden, als Protoplasten aus Sojabohnen-Zellkulturen. Es wurde daher versucht, eine PEG Konzentration zu ermitteln, bei der eine geringe Anzahl beschädigter-,dagegen eine maximale Anzahl agglutinierter bzw. fusionierter Protoplasten resultierten. Diesen Anforderungen wurde eine 40- 45% ige PEG Lösung gerecht. (Endkonzentration 20-22.5% durch Mischung mit der Protoplastensuspension im Verhältnis 1:1)

Im Laufe der folgenden Versuchsansätze wurde deutlich, daß die Protoplasten weniger durch zu hohe PEG Konzentrationen geschädigt wurden, als viel mehr durch mechanische und osmotische Beanspruchung. Die ersten Versuchsansätze waren in Zentrifugengläsern mit relativ großen Materialmengen durchgeführt worden, dabei erforderte das Wechseln der Lösungen und Medien häufiges Zentrifugieren. Während des Isolierungsprozesses konnten auch Mesophyllprotoplasten Zentrifugationen bei 50g ohne deutliche Beschädigung vertragen, dagegen war während oder nach der PEG Behandlung das Plasmalemma so stark beansprucht, daß insbesondere die Mesophyllprotoplasten platzten. Durch die Anwendung der von Kao und Michayluk (1974) beschriebenen Mikrotropfenmethode konnte das Zentrifugieren vollständig vermieden werden,und somit die Vitalität der Protoplasten deutlich erhöht werden. Bei dieser Methode hafteten die in 150 µl enthaltenen Protoplasten an dem in einer Plastikpetrischale befindlichen Deckglas und konnten durch vorsichtige Zugabe und Abpipettieren der verschiedenen Lösungen ohne eine einzige Zentrifugation behandelt werden. Auch Constabel et al(1974), Fowke et al. (1974 und 1976) und Dudits et al. (1976) beschreiben die erfolgreiche Anwendung dieser Methode.
Außer der mechanischen Sensibilität der Protoplasten konnte noch eine starke osmotische Reaktion der Protoplasten auf die PEG Lösung beobachtet werden. Polyäthylenglykol ist ein Kondensationspolymer des Äthylenoxids mit Wasser und hat durch die Äthersauerstoffatome und auch durch die endständigen Hydroxylgruppen, die leicht hydratisiert werden können,hydrophile Eigenschaften. (Fig.6)



Figur 6: Wasseranlagerung des Poyäthylenglykols (PEG)

Auf Grund der starken Hydrophilie des PEGs haben wässrige Lösungen einen bedeutend höheren osmotischen Wert als vergleichbare Saccharoselösungen. Werden Protoplasten mit PEG behandelt, so erfolgt eine schockartige Plasmolyse und gleichzeitige Aggregation der Protoplasten. Von diesem osmotischen Schock erholen sich die meisten Protoplasten nach kurzer Zeit. Es konnte jedoch beobachtet werden, daß eine abrupte Entfernung der PEG Lösung und der Ersatz durch Waschlösung häufig ein Platzen der Protoplasten bewirkte. Es erwies sich daher als vorteilhaft, wie es auch Kao und Michayluk (1974) beschrieben haben, die PEG Lösung erst nach langsamer, stufenweiser Verdünnung zu entfernen. Burgess und Fleming (1974) sahen das Auswaschen der PEG Lösung nicht nur zur Erhöhung der Vitalität der Protoplasten, sondern auch grundsätzlich für den Erhalt fusionierter Protoplasten als erforderlich an. Auch während dieser Arbeit wurde zunächst vermutet, daß die PEG Lösung nur eine starke Plasmolyse und Agglutination bewirkt, und Fusionen erst durch Deplasmolyse während des Waschvorganges erfolgen. Ein Versuch, bei dem die Anzahl fusionierter Protoplasten direkt in der PEG Lösung, nach 1-2 maligem Verdünnen und nach Beendigung des Waschvorganges bestimmt wurde, zeigte deutlich, daß die Fusionswirkung durch die PEG Lösung selbst bedingt war. Es wurden in allen Ansätzen 5-9% mehrkerniger Protoplasten erhalten.

Wie weit schon während der PEG Behandlung eine Vermischung des Cytoplasmas erfolgte, konnte durch lichtmikroskopische Beobachtung allein nicht vollständig geklärt werden. Die Protoplasten zeigten in den meisten Fällen, solange sie in der PEG Lösungwaren, gewisse Abgrenzungen der beiden Partner. (Abb. 12 c). Dies war durch die starke Plasmolyse der Protoplasten bedingt, die eine Cytoplasmaströmung verhinderte. (Kao und Michayluk 1974). Erst nach dem Auswaschen der PEG Lösung und erfolgter Deplasmolyse setzte Cyclosis wieder ein, so daß auch eine vollständige Mischung des Cytoplasmas erfolgen konnte. (Abb. 12 d und 13 c,d)

In diesem Zusammenhang ist die Frage nach der für die Fusion von Protoplasten mit PEG erforderliche Zeit zu klären. In den Arbeiten von Wallin et al.(1974) und Kao et al. (1974) wurde eine PEG Behandlungszeit von 40 - 45 Minuten angegeben. In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, daß die Behandlungsdauer keinen Einfluß auf die Anzahl fusionierter Protoplasten hat. Eine 10 minütige Behandlungszeit resultierte in ebensovielen fusionierten Protoplasten wie eine 45 minütige Behandlung. Auch Wallin et al. (1974) ermittelten, daß Protoplasten schon innerhalb 5 Minuten fusionieren können. Der Versuch zeigte außerdem, daß die Lebensfähigkeit der Protoplasten ebensowenig durch Behandlungszeiten bis zu 45 Minuten beeinflußt wird. Kao und Michayluk konnten Schädigungen der Protoplasten ebenfalls erst nach 16 stündiger Behandlungsdauer feststellen. In den folgenden Versuchen dieser Arbeit wurde daraufhin eine 15-20 minütige Behandlung durchgeführt. Diese Zeit ergab sich durch die jeweils zu bearbeitenden Petrischalen und wurde auch in letzter Zeit von verschiedenen Autoren angegeben. (Constabel et al. 1975, Fowke et al. 1976 und Dudits et al. 1976)

Pelcher et al. (1974) stellten fest, daß der pH Wert des für die Kultur von Protoplasten verwendeten Mediums einen Effekt auf die Stabilität der Protoplasten hat. Entsprechend beobachteten Schenk und Hildebrandt(1969 und 1971) eine geringere Vitalität der Protoplasten, wenn sie in Medium mit einem pH Wert unter 5 gehalten wurden. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß der pH Wert der PEG Lösung einen entscheidenden Einluß auf die Lebensfähigkeit und dadurch bedingt, auch auf die Anzahl fusionierter, lebensfähiger Protoplasten hat. Zwischen Protoplasten aus Mesophyll und Suspensionskulturen waren deutliche Unterschiede in der Sensitivität gegenüber dem pH Wert zu beobachten. Besonders Mesophyllprotoplasten wurden durch PEG Lösung mit einem pH Wert von 4.5 stark geschädigt, während Karottenprotoplasten hier die größte Lebensfähigkeit aufwiesen. Petunia und Atropa-Protoplasten zeigten bei PH 6.2 die größte Vitalität. Der Anteil lebensfähiger Zellen lag bei pH 6.2 für Karotten- Atropa- und Petunia Pro-

toplasten übereinstimmend zwischen 63 und 68%. Dieses Ergebnis steht in direkter Beziehung zur Anzahl gebildeter Heterokaryonten aus Petunia und Atropa bzw. Petunia und Karotten Protoplasten, die in beiden Fällen auf Grund der größeren Lebensfähigkeit bei pH 6.2 optimal war. Bisher war die Verwendung einer PEG Lösung pH 6.2 nur von Constabel et al(1975 a und 1975 b) beschrieben worden, sie machten jedoch keine Äußerung über eventuelle Vorteile dieser Lösung gegenüber der von Wallin et al. (1974) und Kao und Michayluk (1974) verwendeten Lösung des pH Wertes 5.5. Eine Abhängigkeit der Fusionswirkung vom Ca^{++} Gehalt und dem pH Wert der PEG Lösung stellten Wallin et al.(1974) fest. Sie erzielten maximale Ausbeuten aggregierter und fusionierter Protoplasten mit 3mM Ca^{++} und pH Werten zwischen 5 und 6. Offensichtlich spielen zweiwertige Ionen wie Ca^{++} und Mg^{++} für die Agglutination und Fusion von Protoplasten eine bedeutende Rolle. Man kann sich vorstellen, daß die leicht negative Plasmaoberfläche mit der polaren PEG Lösung über die zweiwertigen Ca^{++} Ionen miteinander verbunden werden.Einwertige Kationen wie K^{+} oder Na^{+} können diese Art "Brücke" nicht bilden, sie zeigten auch keinen agglutinations- oder fusionsfördernden Effekt. (Wallin et al. 1974)

Einen wesentlichen Einfluß auf die Fusionsfähigkeit von Protoplasten hat die Zeit nach der Isolierung. Schon Küster (1909) beobachtete, daß nach längerer Plasmolysezeit selbst Subprotoplasten derselben Zelle nicht mehr verschmelzen können. Ebenso waren meiotische Protoplasten nur für etwa 30 Minuten nach der Isolierung fusionsfähig (Ito 1973). In dieser Arbeit wurde festgestellt, daß noch 40 Minuten nach der Protoplastenisolierung maximale Ausbeuten an Heterokaryonten erhalten werden konnten. Nach längerer Zeit nahm die Fusionsfähigkeit ständig ab, und nach 6 Stunden konnten überhaupt keine Heterokaryonten mehr beobachtet werden. Die PEG Behandlung direkt in der Enzymlösung durchzuführen erbrachte keine Steigerung der Anzahl gebildeter Heterokaryonten. Dieser Befund entspricht dem von Wallin et al. (1974) Für das hier beschriebene Verhalten ist die unmittelbar nach der Isolierung der Protoplasten ein-

setzende Zellwandregeneration verantwortlich zu machen, die die Fusionsfähigkeit der Protoplasten vollständig hemmte.

Die Fusion scheint ein Phänomen zu sein, das zwischen Protoplasten aller Pflanzenspecies möglich ist. Bisher sind von vielen Laboratorien Berichte über intra- und interspezifische Fusionen veröffentlicht worden, (Power et al. 1970, Potrykus 1971, Giles 1972, Bajaj und Cocking 1973, Keller und Melchers 1973, Kao et al. 1974, Wallin et al. 1974, Burgess und Fleming 1974, Gosch,Bajaj und Reinert 1975 u.a.) und darüber hinaus war es sogar möglich,die Fusion tierischer Zellen mit pflanzlichen Protoplasten zu induzieren. (Ahkong et al. 1974)

Schwierigkeiten bestehen zur Zeit noch bei der Kombination der einzelnen Prozesse: Isolierung, Fusion und Kultur der Heterokaryonten. Giles (1972) berichtete zuerst über Zellwandregenerationen in interspezifischen Zellaggregaten mit Hilfe von Ammengeweben. Über Teilungen interspezifischer Heterokaryonten berichtete Kao et al.(1974), Constabel et al. (1974), Fowke et al.(1976) u.a. Die Regeneration von Hybriden gelang bisher nur in zwei Fällen aus inter- und intraspezifischen Zellen. Carlson,Smith und Dearing (1972) regenerierten Hybriden aus Nicotiana glauca und Nicotiana langsdorfii. Melchers und Labib (1974) gelang nach Fusion von Tabakmesophyllprotoplasten zweier haploider Mutanten die Regeneration einer diploiden Pflanze. In dieser Arbeit war es möglich, sowohl Homokaryonten ,als auch interspezifische-und Heterokaryonten von Protoplasten verschiedener Pflanzenfamilien zu kultivieren. Die Heterokaryonten zwischen Atropa- und Petunia- bzw. Tabak-als auch die zwischen Karotten- und Petunia- bzw. Tabakprotoplasten bildeten generell innerhalb von 2 Kulturtagen Zellwände. Die verwendeten Modifikationen des TP- und B5 -Mediums eigneten sich für die Kultur aller 4 Protoplastentypen und daher entsprechend auch für die daraus gebildeten Heterokaryonten. Während der ersten Kulturwoche teilten sich diese zu 25- 30% mindestens einmal. Innerhalb dieser Zeit waren sie auf Grund der verschiedenen Merkmale, Anthocyangehalt der Karottenprotoplasten, Chloroplasten der Mesophyll-

protoplasten und der Farblosigkeit mit deutlichen Plastiden der Atropaprotoplasten zu identifizieren. Als weiteres Merkmal wiesen sie Unterschiede in der Intensität der Kernfärbung mit Feulgen oder Carbol Fuchsin auf. Da die als Merkmal verwendeten Chloroplasten insbesondere in den Tabakprotoplasten nach 10 Tagen degenerierten und nicht mehr für die Identifizierung geeignet waren, konnten weitere Teilungen nur selten beobachtet werden. Petunia Protoplasten bildeten in einigen Kulturen über eine längere Zeit Chloroplasten, so daß es in Petunia-Karottenkulturen erstmalig gelang, die Koloniebildung von Heterokaryonten bis zu einem 8-10 Zellenstadium zu verfolgen. Die Koloniebildung der Heterokaryonten aus Atropa-Petunia bzw. Tabak Protoplasten zu beobachten, erwies sich als besonders schwierig, da die Farblosigkeit der Atropaprotoplasten kein ausreichendes Merkmal darstellte, zumal die Mesophyllprotoplasten nach längerer Kulturzeit ebenfalls farblos wurden. Durch Erniedrigung der Protoplastendichte in der Kultur konnte die Identifizierung in gewisser Weise vereinfacht werden. Das von Kao und Michayluk(1975) beschriebene Medium , das neben komplexen Zusätzen wie Proteinhydrolysat und Kokosnußmilch noch verschiedene Zucker, Zuckeralkohole, Aminosäuren und Vitamine enthielt, erlaubte eine Kultur mit nur 10^3 Protoplasten/ ml Medium, dagegen erforderte die Kultur in TP-Medium demebenfalls Kokosnußmilch und Proteinhydrolysat zugesetzt war, 10^4 Protoplasten/ ml Medium.

Zur Auffindung einer Möglichkeit der Selektion von Heterokaryonten wurden Versuche mit habituierten Karottenzellen durchgeführt. Auf Grund der Kombination der Auxinabhängigkeit der Mesophyllprotoplasten mit der Auxinunabhängigkeit der Karottenprotoplasten bei der somatischen Hybridisierung wurde erwartet, daß die echten Hybridzellen neben den Karottenzellen in einem auxinfreiem Medium lebensfähig sein müßten, die reinen Mesophyllprotoplasten aber nicht und auf diese Weise elemeniert werden können. Es zeigte sich jedoch, daß die Karottenprotoplasten habituierter Zellen auf auxinfreiem Medium nur begrenzt lebensfähig waren und sich auch nicht teilten.

Dieses Verhalten der Karottenprotoplasten schloß daher eine partielle Selektion der Heterokaryonten auf diese Weise aus.

Aus der Literatur sind bisher nur sehr wenig Möglichkeiten für die Selektion und Identifizierung echter Hybridzellen und Pflanzen bekannt. Es wurden einerseits genetische, cytologische und enzymatische Merkmale und die Verwendung genetischer Mutanten beschrieben, andererseits wurde die Verwendung von Selektionsmedien postuliert, in denen auf Grund einer kreuzweise unterschiedlichen Empfindlichkeit von Protoplasten verschiedener Species auf bestimmte, dem Medium zugesetzte Substanzen eine Selektion erzielt werden könnte. (Cocking et al. 1974).
Carlson et al. (1972) konnten durch Verwendung eines auxinfreien Mediums, das nur das Wachstum von Hybridzellen aus Nicotiana glauca und Nicotiana langsdorfii erlaubte, Pflanzen aufziehen. Zur weiteren Identifizierung der Hybridpflanzen wurden die Morphologie der Blätter, Haare der Blätter Tumorbildung der Pflanzen, Chromosomenzahlen und die Peroxidase Isoenzymmuster herangezogen. Die erhaltenen somatischen Hybriden entsprachen in allen Kriterien den durch sexuelle Kreuzung erhaltenen Hybriden, so daß angenommen wurde, tatsächlich Hybridpflanzen über die Fusion somatischer Zellen erhalten zu haben. (Carlson et al. 1973)
Eine andere Möglichkeit zur Aufzucht somatischer Hybridpflanzen wendeten Melchers und Labib(1974) und Schieder (1975) an. Während es Melchers und Labib (1974) gelungen war, nach Fusionen genetisch unterschiedlicher,hellgrüner, haploider Tabakmutanten normalgrüne diploide Hybridpflanzen zu regenerieren, konnte Schieder auf ähnliche Weise aus zwei nicotinsäure- bzw. glucoseauxotrophen Mutanten von Spaerocarpus-Hybridpflanzen isolieren.
Eine Methode zur Selektion von Hybridzellen aus Petunia und Parthenocissus Protoplasten wurde von Power et al(1975) beschrieben. Sie nutzten das unterschiedliche Verhalten von Petunia und Parthenocissus-Protoplasten in verschiedenen Medien kombiniert mit der Auxinautotrophie der Parthenocissus Protoplasten aus und konnten so einen "Hybridkallus" selktio-

nieren. Dieser "Hybridkallus" wies über ein Jahr lang die Peroxidaseisoenzymmuster beider Elternpartner auf. Jedoch konnte bei cytologischen Untersuchungen des selktionierten Kallus niemals Kernmaterial von Petunia identifiziert werden. Das Ergebnis von Power et al.(1975) läßt die Vermutung aufkommen, daß ebenso wie bei sexuellen Kreuzungen auch bei der somatischen Hybridisierung systematisch weit entfernter Pflanzenfamilien Inkompatibilitätsreaktionen auftreten können, die hier eine Eliminierung von Chromosomen eines Partners zur Folge haben. Solches Verhalten wurde schon von Weiss und Green (1967) während der Kultur tierischer Hybridzellen beobachtet.

Bei parallel durchgeführten Versuchen dieser Arbeit, Heterokaryonten von Protoplasten der gleichen Pflanzenfamilie,(Atropa / Petunia bzw. Tabak) und Heterokaryonten von Protoplasten systematisch weit entfernter Pflanzenfamilien (Karotte / Petunia bzw. Tabak) zu kultivieren, waren alle erhaltenen Typen von Heterokaryonten zu einem bestimmten Prozentsatz teilungsfähig. Dieses Verhalten schloß aber eventuell vorhandene Inkompatibilität nicht aus, dazu bedurfte es umfassender cytologischer Untersuchungen.

Für die Ausbildung echter Hybridzellen ist es erforderlich, daß auch die Kerne der unterschiedlichen Partner fusionieren und sich synchron über eine gemeinsame Spindel teilen, so daß hybridisierte Tochterzellen entstehen können. Cocking (1971) vermutete, daß Kernfusionen während der Mitose stattfinden, wobei natürlich die Synchronie der Zellen Voraussetzung ist. Die Vermischung der Chromosomen während der Metaphase und die Ausbildung einer gemeinsamen Spindel konnten Ito und Maeda (1974) mit Hilfe synchronisiert teilender Protoplasten nachweisen. Die Fusion homokaryontischer Interphasekerne konnten Miller et al.(1971) und ebenso Constabel et al. (1975) bei heterokaryontischen Interphasekernen beobachten. Eine sichere Identifizierung fusionierter, heterokaryontischer Interphasekerne war in dieser Arbeit nicht möglich, da das Merkmal "unterschiedliche Intensität" der Kernfärbungen nicht ausreichte. Eine bedeutend bessere Beurteilung des Kernverhaltens der

Homo- und Heterokaryonten war dagegen durch Untersuchungen von Mitosestadien möglich.
Während Miller et al. für homokaryontische vielkernige Protoplasten nachweisen konnte, daß diese sich häufig synchron teilen, war es in dieser Arbeit zum ersten Mal möglich, synchrone Teilungen nicht nur in heterokaryontischen Zellen, sondern auch in bis zu 7 Tage alten inzwischen gebildeten Hybridkolonien zu beobachten. Normalerweise zeigten die in den untersuchten Kulturen vorhandenen Atropa- und Petuniazellen zu unterschiedlichen Zeiten nach der Isolierung und Fusion der Protoplasten die ersten Zellteilungen; Petuniazellen früher als Atropazellen. In den gebildeten Heterokaryonten dagegen waren in einigen Fällen vollkommen synchrone Teilungen der Partner zu beobachten, so daß in diesen eine "Selbstsynchronisation" stattgefunden haben mußte. Dieses Phänomen muß durch einen Einfluß der im Zellcyclus weiter fortgeschrittenen Kerne auf die im früheren Stadium befindlichen Kerne bedingt sein, wie es auch 1966 von Rusch et al. angenommen wurde. Das Auftreten nicht synchrorisiert teilender Heterokaryonten deutet darauf hin, daß die Faktoren, welche die Synchronisierung kontollieren, unter Umständen nicht in jeder Zelle wirksam werden können, oder aber auch nur während eines ganz bestimmten Stadiums des Zellcyclus eingreifen können.

In einigen, synchronisiert teilenden, mehrkernigen Zellen war eine Vermischung der Atropachromosomen und der Petuniachromosomen in der Metaphase und darüber hinaus sogar in der Anaphase zu beobachten. Eine von einem Heterokaryonten gebildete sich synchron teilende 7 Tage alte Kolonie zeigte einen Metaphasekern, der vermischt mit Atropachromosomen die für Petunia spezifischen 14 größeren Chromosomen aufwies. Weitere in der Kolonie befindliche Metaphasestadien zeigten innerhalb der Atropachromosomen nur vereinzelte Petuniachromosomen, die bedingt durch eventuelle Inkompatibilität auf einen Eliminierungsvorgang hinweisen. Die außerdem in der Kolonie erkennbaren Metaphasen reiner Petuniakerne, lassen keine Rückschlüsse auf Inkompatibilitätsreaktionen zu, sie sind wahr-

scheinlich aus einem , in der Hybridzelle zusätzlich enthaltenen Petuniakern hervorgegangen.
Die Beobachtung einer weiteren Hybridzelle, bei der über die Ausbildung einer gemeinsamen Spindel auch noch in der Anaphase Petunia- und Atropachromosomen gemeinsam und vollständig vorlagen, zeigt deutlich, daß in diesem Fall bis zu diesem Stadium keine Inkompatibilitätsreaktionen erfolgt waren, so daß bei fortgesetzter Teilung solcher Zellen absolut die Möglichkeit besteht, Hybridkallus mit vollständigem Genom zu erhalten.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Material erlaubte keine Selektion der Heterokaryonten noch der echten Hybridzellen durch Manipulation der Kulturbedingungen. Es wurden daher neben den laufend durchgeführten cytologischen Untersuchungen alle vorhandenen Kolonien aufgezogen und in den regenerierten Kalli Differenzierungen induziert. Die morphogenetischen Fähigkeiten der Protoplasten waren durch die Fusionsbehandlung nicht beeinträchtigt worden. Es konnten insgesamt 76 Pflanzen aufgezogen werden. Innerhalb dieser wurde eine polyploide Pflanze regeneriert, die neben Tabakchromosomen ein Chromosom aufwies, das denen von Karotten in Größe und Intensität der Färbung ähnlich ist. Bisher fehlen jedoch Methoden zur eindeutigen Identifizierung. Eine Fortsetzung dieser Arbeit stünde daher unter dem Aspekt der Ermittlung weiterer biochemischer, genetischer und cytologischer Merkmale, die eine Selektion und sichere Identifizierung von Hybridzellen und - Pflanzen ermöglichen.

Die in dieser Arbeit dargelegten Beobachtungen und Ergebnisse geben zu der berechtigten Hoffnung Anlaß, in naher Zukunft Hybridpflanzen zu erhalten, die das genetische Material zweier sehr verschiedener Species in sich vereinigen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Zellsuspensionen eines anthocyanhaltigen Stammes von Daucus carota cv. Rote Riesen und Atropa belladonna cv. lutea Döll konnten mit einer Enzymmischung aus 1.5% Cellulase Onozuka R10 und 0.5% Macerozym R10 innerhalb von 4.5 Stunden bis zu 95% Protoplasten isoliert werden. Außerdem war es möglich, Protoplasten aus Blättern von Nicotiana tabacum cv. Badischer Burley und Petunia hybrida cv. sattelite zu isolieren. Die Inkubation in 0.1% Macerozym R10 und 0.5% Cellulase R10 bei 22°C für 16 Stunden resultierte in einer Ausbeute von $6 \cdot 10^5$ intakter Protoplasten pro g Blattmaterial. Neben dem Alter und physiologischen Zustand des Zellmaterials wurde die Isolierung von Protoplasten durch Art und Konzentration der Enzyme und der Temperatur beeinflußt.

Während der Kultur der Karotten-, Atropa-, Petunia-, diploiden und haploiden Tabakprotoplasten in entsprechenden Nährmedien, regenerierten die Protoplasten innerhalb von 48 Stunden Zellwände. Zellteilungen wurden 3 Tage nach der Isolierung beobachtet. Aktives Teilungswachstum führte zur Kallusbildung. Durch quantitative und qualitative Veränderungen der Phytohormone im Kulturmedium konnten bei allen 4 Species morphogenetische Reaktionen induziert werden. Während die aus Karotten- und Atropaprotoplasten regenerierten Kalli nach Embryogenese in vitro intakte Pflanzen bildeten, wurde die Regeneration von Petunia- und haploiden und diploiden Tabakpflanzen über Organogenese induziert. Die Teilungsaktivität der Protoplasten wurde durch die Zusammensetzung des Mediums, die Konzentration des darin enthaltenen Plasmolytikums und auch durch die Anzahl der in der Kultur vorhandenen Protoplasten beeinflußt. Die morphogenetische Aktivität der Karotten-, Atropa- und Petunia-Zellen konnte durch Entzug des Auxins angeregt werden. Zur Induktion der Organogenese in regeneriertem Tabakkallus war ein bestimmtes Verhältnis von Auxin und Cytokinin erforderlich. Vom Zeitpunkt der Protoplastenisolierung bis zur Regeneration von Pflänzchen waren insgesamt 14 Wochen erforderlich.

Der Vergleich der Effizienz verschiedener Fusionsmittel, $NaNO_3$, $CaCl_2$ und Polyäthylenglykol (PEG) zeigte eine deutliche Überlegenheit der PEG Methode. Für die in dieser Arbeit verwendeten Protoplasten war es erforderlich, die PEG Methode soweit zu verbessern, daß eine möglichst große Anzahl lebensfähiger Heterokaryonten erhalten werden konnte. Bei der Behandlung der jeweiligen Fusionspartner,(Karotte / Petunia bzw. Tabak und Atropa / Petunia bzw. Tabak) in Mikrokulturen mit 45% iger PEG Lösung pH 6.2 für 15 - 20 Minuten konnten maximal 10% Heterokaryonten erzielt werden. Während der Kultur der Homokaryonten und Heterokaryonten zusammen mit den nicht fusionierten Protoplasten in einem komplexen Medium in einer Dichte von 10^3 Protoplasten pro ml Medium konnten innerhalb einer Kulturwoche 25 -30% mindestens einmal geteilter Heterokaryonten erhalten werden. Die Heterokaryonten waren auf Grund der unterschiedlichen Farben der Protoplasten (rot, grün und farblos), als auch durch die Größe der Chromosomen und der unterschiedlichen Intensität der Kernfärbungen mit Feulgen oder Carbol Fuchsin zu identifizieren. Die cytologischen Untersuchungen zeigten bei den mehrkernigen Zellen häufig einen synchronen Zellcyclus. In mehreren Metaphasestadien konnte die eindeutige Vermischung unterschiedlichen Kernmaterials festgestellt werden. Die Beobachtung von Anaphasestadien mit gemischtem Chromosomensatz beweist, daß eine gemeinsame Spindelbildung und damit die Ausbildung eines echten Hybridkallus möglich ist. In einigen Fällen konnten "Hybridkolonien" von 8- 12 Zellen beobachtet werden. Die klonale Aufzucht aller in der Kultur vorhandenen Kolonien und nachfolgende Induktion der Morphogenese führte zur Aufzucht intakter, zum Teil polyploider Pflanzen. Eine der regenerierten Pflanzen wies neben Tabakchromosomen 1 Chromosom auf, das in seiner Größe und Farbintensität einem Karottenchromosom entsprach.

6. LITERATURVERZEICHNIS

AHKONG, Q.F., J.J. HOWELL, J.A. LUCY, F. SAFWAT, M.R. DAVEY and E.C, COCKING, 1975: Fusion of hen erythrocytes with yeast protoplasts induced by polyethylene glycol. Nature 225, 66- 67

AOKI, S., I. TAKEBE, 1969: Infection of tobacco mesophyllprotoplasts by tobacco mosaic virus ribonucleic acid. Virology 39, 439 - 448

BAJAJ, Y.P.S., 1972: Protoplast culture and regeneration of haploid tobacco plants. Amer. J. Bot. 59 (6) 647

BAJAJ, Y.P.S., 1974: Potentials of protoplast work in agriculture. Euphytica 23, 633 - 649

BAJAJ, Y.P.S. and E.C. COCKING, 1973: The isolation, culture and fusion of pollen protoplasts. In Vitro 8 (5), 420

BAWA, S.B. and J.G. TORREY, 1971: "Budding" and nuclear division in cultured protoplasts of corn, convolvulus and onion. Bot. Gaz. 132, 240 - 245

BERGMANN, L. 1960: Growth and division of single cells of higher plants in vitro. J. gen. Physiol. 43, 841 - 851

BINDING, H. 1966: Regeneration und Verschmelzung nackter Laubmoosprotoplasten. Z. Pflanzenphysiol. 55, 305 - 321

BINDING, H. 1974: Fusionsversuche mit isolierten Protoplasten von Petunia hybrida L. Z. Pflanzenphysiol. 72, 422- 426

BINDING, H. 1974a: Cell cluster formation by leaf protoplasts from axenic cultures of haploid Petunia hybrida L. Plant Sci. Letters 2, 185 - 188

BINDING, H.,1974b: Regeneration von haploiden und diploiden Pflanzen aus Protoplasten von Petunia hybrida L.
Z. Pflanzenphysiol. 74, 298 - 326

BINDING, H., 1975: Reproducibly high plating efficiencies of isolated mesophyll protoplastes from shoot cultures of tobacco.
Physiol. Plant. 35, 225 - 227

BHOJWANI, S.S. and E.C. COCKING, 1972: Isolation of protoplasts from pollen tetrades.
Nature New Biol. 239, 29 - 30

BLAKELY, L.M. and F.C. STEWARD, 1964: Growth and organized development of cultured cells. V. The growth of colonies from free cells in nutrient agar.
Am. J. Bot. 51, 780 - 791

BOGERS, R.J.,1973: The use of protoplasts for the study of root nodule symbiosis in Pisum sativum. pp. 397 - 407
In: Colloq. Inernat. C.N.R.S. (Versailles) Editions de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris

BRIGHT, S.W.J. and D.H. NORTHCOTE, 1974: Protoplast regeneration from normal and bromodeoxyuridine resistant sycamore callus.
J. Cell Sci. 16, 445 - 463

BUI- DANG- HA, D. and I.A. MACKENZIE, 1973: The division of protoplasts from Asparagus officinalis L. and their growth and differentiation. Protoplasma 78, 215 - 221

BURGESS , J. and E.N.FLEMING, 1974: Ultrasturctural studies on the aggregation and fusion of plant protoplasts.
Planta (Berl.) 118, 183- 193

BURGESS, J., J.W. WATTS, E.N. FLEMING and J.M. KING, 1973: Plasmalemma fine structure in isolated tobacco mesophyll protoplasts.
Planta (Berl.) 110, 291 - 301

CARLSON, P.S., 1973: The use of protoplasts for genetic research.
Proc. nat. Acad. Sci. (U.S.) 70, 598 -602

CARLSON, P.S., 1973: Towards a parasexual cycle in higher plants. In: Colloq. Internat. C.N.R.S. (Versailles) Editions de l´ Institut National de la Recherche Agronomique, Paris pp. 497 - 505

CARLSON, P.S., H.H. SMITH and R.D. DEARING, 1972: Parasexual interspecific plant hybridisation.
Proc. nat. Acad. Sci. (U.S.) 69, 2292 - 2294

CARR, D.H. and J. WALKER, 1961: Carbol fuchsin as a stain for human chromosomes.
Stain Technol. 36, 233 - 236

CAVALLI- SFORZA, L., : Biometrie, Grundzüge biologisch medizinischer Statistik.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1969

CHUPEAU, Y. and G. MOREL, 1970: Obtention de protoplastes de plantes superieurs a´ partier de tissues cultivés in vitro.
C.R. Acad. Sci. (Paris) 270, 2695 - 2662

COCKING, E.C. , 1960: A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles.
Nature (Lond) 187, 927 -929

COCKING, E.C., 1961: Properties of isolated protoplasts.
Nature (Lond.) 191, 780 -782

COCKING, E.C., 1970: Virus uptake, cell wall regeneration, and virus multiplication in isolated plant protoplasts.
Int. Rev. Cytology, 28, 89 - 124

COCKING, E.C., 1971: Fusion of isolated protoplasts: A first step towards the somatic hybridisation of plants. pp. 303-317 In: Les cultures de tissues de plantes C.N.R.S. Paris

COCKING, E.C. 1972: Plant cell protoplasts - Isolation and development.
An. Rev. Pl. Physiol. 23, 29 - 50

COCKING, E.C. 1973: Plant cell modification: Problems and perspectives. pp. 327 - 341. In: Colloq. Internat. C.N.R.S. (Versailles) Protoplastes et fusions de cellules somatiques végetales. Editions de l´ Institut National de la Recherche Agronomique Paris.

COCKING, E.C. and J.E. PEBERDY, 1974: The use of protoplasts from fungi and higher plants as a genetic system. A practical handbook. Publ. Dept. of Botany, University of Nottingham.

COCKING, E.C., J.B. POWER, P.K.EVANS, F.SAFWAT, E.M. FREARSON, C. HAYWARD, S.F. BERRY and D. GEORGE, 1974: Naturally occuring drug sensitivities of cultured plant protoplasts. Plant Sci. Letters, 3, 341 - 350

CONSTABEL, F., D. DUDITS, O.L. GAMBORG and K.N. KAO, 1975 b: Nuclear fusion in intergeneric heterokaryons, a note. Can. J. Bot. 53, 2092 - 2095

CONSTABEL, F. and K.N. KAO, 1974: Agglutination and fusion of plant protoplasts by polyethylene glycol. Can. J. Bot. 52, 1603 - 1606

CONSTABEL, F., J.W. KIRKPATRICK and O.L. GAMBORG, 1973: Callus formation from protoplasts of Pisum sativum. Can. J. Bot. 51, 2105 - 2106

CONSTABEL, F., J.W. KIRKPATRICK, K.N. KAO and K.K. KARTHA, 1975 a: The effect of canavanine on the growth of cells from suspension cultures and on intergeneric heterokaryons of canavanine sensitive and tolerant plants. Biochem. Physiol. Planzen. 168, 319 - 325

COUTTS, R.H.A. and K.R. WOOD, 1975: The isolation and culture of cucumber mesophyll protoplasts. Plant Sci. Letters 4, 189 -193

DAVEY, M.R. and E.C. COCKING, 1972: Uptake of bacteria by isolated higher plant protoplasts. Nature (Lond.) 239, 455 - 456

DAVEY, M.R., E. BUSH and J.B. POWER, 1974: Cultural studies of a dividing legume leaf protoplast system. Plant Sci. Letters 3, 127 - 133

DONN, G., D. HESS und I. POTRYKUS, 1973: Wachstum und Differenzierung in aus isolierten Protoplasten von Petunia hybrida enstandenem Kallus. Z. Pflanzenphysiol. 69, 423- 437

DUDITS, D., K.N. KAO, F. CONSTABEL and O.L. GAMBORG, 1976: Embryogenesis and formation of tetraploid and hexaploid plants from carrot protoplasts.
Can. J. Bot. 54, 1063 - 1067

DURAND ,J. I. POTRYKUS and G. DONN, 1973: Plant issues de protoplastes de Pétunia.
Z. Pflanzenphysiol. 69, 26

EARLE, D.E. and J.G. TORREY, 1965: Colony formation by isolated convolvulus cells plated on modified media.
Plant Physiol. 40, 520 - 528

ENZMANN- BECKER, G., 1973: Plating efficiency of protoplasts of tobacco in different light conditions.
Z. Naturforsch. 28c, 470 - 471

ERIKSSON, T., 1970: Isolation and fusion of plant protoplasts. pp. 297 - 302, In: Colloq. Internat. C.N.R.S. Les cultures de tissues de plantes (Paris)

ERIKSSON, T., H. BONNET, K. GLIMELIUS and A. WALLIN 1974: Technical advances in protoplast isolation, culture and fusion. In: Tissue culture and plant science Ed. H.E. Street Acad. Press

ERIKSSON,T. and K.JONASSON, 1969: Nuclear division in isolated protoplasts from cells of higher plants grown in vitro.
Planta (Berl.) 89, 85 - 89

EVANS, P.K., A.G. KEATES and E.C. COCKING, 1972: Isolation of protoplasts from cereal leaves.
Planta (Berl.) 104, 178 - 181

EVANS, P.K., J. WOODROCK and A.G. KEATES, 1973: Steps towards cell fusion: Studies on cereal protoplasts and protoplasts of haploid tobacco. pp. 469 - 477 In: Colloq. Internat. C. N. R. S. (Versailles) Protoplastes et fusions de cellules somatiques végetales. Editions de l´ Institut National de la Recherche Agronomique Paris.

FOWKE, L.C., C.W. BECH- HANSEN, O.L. GAMBORG and J.P. SHYLUK 1973: Electron microscopic observations of cultured cells and protoplasts of Ammi visnaga.
Amer. J. Bot. 60, 304 - 312

FOWKE, L.C., C.W. BECH- HANSEN, F. CONSTABEL and O.L. GAMBORG, 1974: A comperative study on the ultrastructure of cultured cells and protoplasts of soybean during cell division. Protoplasma 81, 189 - 203

FOWKE, L.C., P.R. RENNIE, J.W. KIRKPATRICK and F. CONSTABEL, 1976: Ultrastructure of fusion products from soybean cell culture and sweet glover leaf protoplasts. Planta (Berl.) 130, 39 - 45

FREARSON, E. M., J. B. POWER and E.C. COCKING, 1973: The isolation and culture of Petunia leaf protoplasts. Dev. Biol. 33, 130 - 137

GAMBORG, O.L., K.N. KAO, R.A. MILLER, L.C. FOWKE and F. CONSTABEL, 1973: Cell regeneration, division and plant development from protoplasts. pp. 155 - 173, In : Colloq. Internat. C.N.R.S. (Versailles) Editions d l' Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.

GAMBORG, O.L., R.A. MILLER, K.OHYAMA, 1968: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50, 151 - 158

GAMBORG, O.L. and R.A. MILLER, 1973: Isolation culture and use of plant protoplasts. Can J. Bot. 51, 1795 - 1799

GAMBORG, O.L., J. SHYLUK and K.K. KARTHA, 1975: Factors affecting the isolation and callus formation in Protoplasts from shoot apies of Pisum sativum L. Plant Sci. Letters 4, 285 - 292

GIBBS, J.L. and DOUGALL, D.K., 1965: The growth of single cells from Nicotiana tabacum callus tissue in nutrient medium containing agar. Exptl. Cell Res. 40, 85 - 95

GILES, K. L., 1972: An interspecific aggregate cell capable of cell wall regeneration. Plant & Cell Physiol. 13, 207 - 210

GILES, K.L. and SARAFIS, V., 1971: On the survival and reproduction of chloroplasts outside the cell. Cytobios. 4, 61 - 74

GLEBA, Y.Y., SHVYDKAYA, L.G. , R.G. BUTENKO and K.M. SYTNIK, 1974: Cultivation of isolated protoplasts.
Sow. Plant. Physiol. 21, 486 - 492

GLIMELIUS, K., A. WALLIN and T. ERIKSSON, 1974: Agglutinating effect of concanavalin A on isolated protoplasts of Daucus carota.
Physiol. Plant. 31, 225 - 230

GOSCH, G., Y.P.S. BAJAJ and J. REINERT, 1975 a: Isolation, culture and fusion studies on protoplasts from different species.
Protoplasma 85, 327 - 336

GOSCH, G., Y.P.S. BAJAJ and J. REINERT, 1975 b: Isolation, culture and induction of embryogenesis in protoplasts from cell suspensions of Atropa belladonna.
Protoplasma 86, 405 - 410

GRAMBOW, H.J., K.N. KAO, R.A. MILLER and O.L. GAMBORG, 1972: Cell division and plant development from protoplasts of carrot cell suspensions.
Planta (Berl.) 103, 348 - 355

GREENWAY, H., 1970: Effects of slowly permeating osmotica on metabolism of vaculated and nonvaculated tissues.
Plant Physiol. 46, 254- 258

GREGORY, D.W. and E.C. COCKING, 1965: The large scale isolatio of protoplasts from immature tomato fruit.
J. Cell Biol. 24, 143 - 146

GROUT, B.W.W.,1975: Cellulose microfibril deposition at the plasmalemma surface of regenerating tobacco meophyll protoplasts: A deep etch study.
Planta (Berl.) 123, 275 - 282

HARTMANN, J.X., K.N. KAO, O.L. GAMBORG and R.A. MILLER, 1973: Immunological methods for the agglutination of protoplasts from cell suspension cultures of different genera.
Planta (Berl.) 112, 45 - 56

HANKE, D.E. and D.H. NORTHCOTE, 1974: Cell wall formation by soybean callus protoplasts.
J. Cell Sci. 14, 29 - 50

HELLMANN, S. und J. REINERT, 1971: Protoplasten aus Zellkulturen von Daucus carota.
Protoplasma 72, 479 - 484

HELLMANN, S., 1976: Isolierung und Kultur von Protoplasten aus Daucus carota und ihre Eigenschaften.
Dissertation Freie Universität Berlin

HESS, D. and I. POTRYKUS, 1972: Teilung isolierter Protoplasten von Petunia hybrida.
Naturwiss. 59, 273 - 274

HOFFMANN, F.,1973: Die Aufnahme doppelt markierter DNS in isolierte Protoplasten von Petunia hybrida.
Z. Pflanzenphysiol. 69, 249 - 261

HOFMEISTER, L.,1954: Mikrurgische Untersuchungen plasmolysierterter nackter Pflanzen Protoplasten.
Protoplasma XLIII, 278 - 326

HORINE, R.K. and A.W. RUESINK, 1972: Cell wall regeneration around protoplasts isolated from convolvulus tissue culture.
Plant Physiol. 50, 438 - 445

ITO, M., 1973: Studies on the behavior of meiotic protoplasts. I. Isolation from microsporocytes of liliaceous plants.
Bot. Mag. Tokyo 86, 133 - 141

ITO , M., 1973: Studies on the behavior of meiotic protoplasts. II. Induction of a high fusion freqency in protoplasts from liliaceous plants.
Plant& Physiol. 14, 865 - 872

ITO, M. and MAEDA, M., 1973: Fusion of meiotic protoplasts in liliaceous plants.
Exptl. Cell Res. 80, 453 - 456

ITO, M. and M. MAEDA, 1974: Meiotic division and fusion of nuclei in multinucleated cells from the induced fusion of meiotic protoplasts of liliaceous plants.
Bot. Mag. Tokyo 87, 219 - 228

KAMEYA, T., 1973: The effects of gelatin on aggregation of protoplasts from higher plants.
Planta (Berl.) 115, 77 - 82

KAMEYA, T. and N. TAKAHASHI, 1972: The effect of inorganic ions on fusion of protoplasts from roots and leafs of Brassica species.
Jap. J. Genet. 47, 215 - 218

KAMEYA, T. and H. UCHIMIYA, 1972: Embryoids derived from isolated protoplasts of carrot.
Planta (Berl.) 103, 356 - 360

KANAI, R. and G.E. EDWARDS, 1973: Purification of enzymatically isolated mesophyll protoplasts from C_3, C_4 and crassulacean acid metabolism plants using an aquous dextran polyethylene glykol two phase system.
Plant Physiol. 52, 484 - 490

KAO, K.N., F. CONSTABEL, M.R. MICHAYLUK and O.L. GAMBORG, 1974: Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells.
Planta 120, 215 - 227

KAO, K.N., O.L. GAMBORG, M.R. MICHAYLUK, W.A. KELLER and R.A. MILLER, 1973: The effects of sugars and inorganic salts on cell regeneration and sustained division in plant protoplasts. pp. 207 - 213, In: Colloq. Internat. C.N.R.S. (Versailles) Editions de l´ Institut National de la Recherche Agronomique Paris.

KAO, K.N., O.L. GAMBORG, and R.A. MILLER, 1971: Cell division in cells regenerated from soybean and Haplopappus gracilis.
Nature, New Biol. 232, 124

KAO, K.N., W.A. KELLER and R.A. MILLER, 1970: Cell division in newly formed protoplasts of soybean.
Exptl. Cell Res. 62, 338 - 340

KAO, K.N. and M.R. MICHAYLUK, 1974: A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts.
Planta (Berl.) 115, 355 - 367

KAO, K.N. and M.R. MICHAYLUK, 1975: Nutritional requirements for growth of Vicia hajastana cells and protoplasts at a very low population density in liquid media.
Planta (Berl.) 126, 105 - 110

KARTHA, K.K., O.L. GAMBORG, F. CONSTABEL and K.N. KAO, 1974: Fusion of rapeseed and soybean protoplasts and subsequent division of heterokaryocytes.
Can. J. Bot. 52, 2453 - 2436

KARTHA, K.K., M.R. MICHAYLUK, K.N. KAO, O.L. GAMBORG and F. CONSTABEL, 1974: Callus formation and plant regeneration from mesophyll protoplasts of rape plants (Brassica napus L. cv. Zephyr).
Plant Sci. Letters 3, 265 - 271

KELLER, W.A., B. HARVEY, O.L. GAMBORG, R.A. MILLER and D.E. EVERLEIGH, 1970: Plant protoplasts for use in somatic cell hybridisation.
Nature 226, 281 - 282

KELLER, W.A., B.L. HARVEY, K.N. KAO, R.A. MILLER and O.L. GAMBORG, 1973: Determination of the frequency of interspecificprotoplast fusion by differential staining. pp. 456 - 463 In: Colloq. Internat. C.N.R.S. (Versailles) Editions de l´ Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.

KELLER, W.A. and G. MELCHERS, 1973: The effect of high pH and Calcium on tobacco leaf protoplast fusion.
Z. Naturforsch. 28c, 737 - 741

KLERCKER, I.A.F. 1892: Eine Methode zur Isolierung lebender Protoplasten.
Svenka. Vet. Akad. Forh. Stockholm 9, 463 - 471

KÜSTER, E., 1909: Über die Verschmelzung nackter Protoplasten.
Ber. Deutsch. Bot. Ges. 27, 589 - 598

LANDGREEN, C.R. and J.G. TORREY, 1973: The culture of protoplasts derived from explants of seedling pea roots. pp. 281-289. In: Colloq. Internat. C.N.R.S. (Versailles) Editions de l´ Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.

MARETZKI, A. and L.G. NICKELL, 1973: Formation of protoplasts from sugar cane cell suspensions and the regeneration of cell cultures from protoplasts. pp. 51 - 63. In: Colloq. Internat. C.N.R.S. (Versailles) Editions de l´ Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.

MARETZKI, A., M.THAM and L.G. NICKELL, 1974: Utilisation and metabolism of carbohydrates in cell and callus cultures. pp. 329 - 361. In: H.E. Street (Ed.) Tissue culture and plant science, Acad. Press London.

MEYER, Y., 1974: Isolation and culture of tobacco mesophyll-protoplasts using a saline medium.
Protoplasma 81, 363 - 372

MEYER, Y. and W.O. ABEL, 1975 a: Importance of the wall for cell division and in the activity of the cytoplasm in cultured tobacco protoplasts. Planta (Berl.) 123, 33 - 40

MEYER, Y. and W.O. ABEL, 1975 b: Budding and cleavage division of tobacco mesophyll protoplasts in relation to pseudo wall and wall formation.
Planta (Berl.) 125, 1 - 13

MAYO,M.A. and E.C. COCKING, 1969: Pinocytic uptake of polystyrene latex particels by isolated tomato fruit protoplasts.
Protoplasma 68, 223 - 230

MELCHERS, G. and G. LABIB, 1974: Somatic hybridisation of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrids of haploid light sensitive varieties of tobacco.
Molec. Gen. Genetics 135, 277 - 294

MESSERSCHMIDT, M., 1974: Kallusbildung und Differenzierung aus isolierten Protoplasten von Pharbitis nil.
Z. Pflanzenphysiol. 74, 175 - 178

MICHAYLUK, M.R. and K.N. KAO, 1975: A comperative study of sugars and sugar alcohols on plant regeneration and sustained cell divisions in plant protoplasts.
Z. Pflanzenphysiol. 75, 181 - 185

MICHEL, W. 1937: Über die experimentelle Fusion pflanzlicher Protoplasten.
Arch. Exptl. Zellforsch. 20, 230

MILLER, R.A., O.L. GAMBORG, W.A. KELLER and K.N. KAO, 1971: Fusion and division of nuclei in multinucleated soybean protoplasts.
Can. J. Genet. Cytol. 13, 347 - 353

MURASHIGE, T. and F. SKOOG, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassys with tobacco tissue cultures.
Physiologica Plantarum 15, 473 - 497

NAGATA, T. and I. TAKEBE, 1971: Plating of isolated mesophyll protoplasts on agar medium.
Planta (Berl.) 99, 12 - 20

NAGATA , T. and I. Takebe, 1970: Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts.
Planta (Berl.) 92, 301 - 308

NAGATA, T. and T. YAMAKI, 1973: Electron microscopy of isolated mesophyll protoplasts cultured in vitro.
Z. Pflanzenphysiol. 70, 452 - 459

NICKELL, L.G. and J.G. TORREY, 1969: Crop improvement through plant cell and tissue culture.
Science 166, 1068 - 1070

OHYAMA, K., O.L. GAMBORG and R.A. MILLER, 1972: Uptake of exogenous DNA by plant protoplasts.
Can. J. Bot. 50, 2077 - 2080

OHYAMA, K. and J.P. NITSCH, 1972: Flowering haploid plants obtained from protoplasts of tobacco leaves.
Plant and Cell Physiol. 13, 229 - 236

OTSUKI, Y. and I. TAKEBE, 1969: Isolation of intact mesophyll cells and their protoplasts from higher plant cells.
Plant&Cell Physiol. 10, 917 - 921

PEARCE, R.S. and E.C. COCKING, 1973: Behavior in culture of isolated protoplasts from "Paul´s Scarlet" rose suspension culture cells.
Protoplasma 77, 165 - 180

PELCHER, L.E., O.L.GAMBORG and K.N. KAO, 1974: Bean mesophyll protoplasts: Production, culture and callus formation.
Plant Sci. Letters 3, 107 - 111

POJNAR, E., J.H.M. WILLISON and E.C. COCKING, 1967: Cell wall regeneration by isolated tomato fruit protoplasts. Protoplasma 64, 460 - 480

POTRYKUS, I., 1971: Intra and interspecific fusion of protoplasts from petals of Torenia baillonii and Torenia Fournier Nature, New Biol. 231, 57 - 58

POTRYKUS, I., 1971 b: Fusionen von Protoplasten mit gut sichtbaren Kernen. Die Naturwiss. 58, 328

POTRYKUS, I., 1972: Fusion of differentiated protoplasts. Phytomorphology 22, 91 - 96

POTRYKUS, I., 1973: Transplantation of chloroplasts into protoplasts of petunia. Z. Pflanzenphysiol. 70, 364 -366

POTRYKUS, I. and J. DURAND, 1972: Callus formation from single protoplasts of petunia. Nature, New Biol. 237, 286 - 287

POTRYKUS, I. and F. HOFFMANN, 1973: Transplantation of nuclei into protoplasts of higher plants. Z. Pflanzenphysiol. 69, 287 - 289

POWER, J.B. and E.C. COCKING., 1968: A simple method for the isolation of very large numbers of leaf protoplasts by using mixtures of cellulase and pectinase. Biochem. J. 110, 33

POWER, J.B., S.E. CUMMINS and E.C. COCKING, 1970: Fusion of isolated plant protoplasts. Nature, 225, 1016 - 1018

POWER, J.B., E.M. FREARSON, C. HAYWARD and E.C. COCKING, 1975 Some consequences of the fusion and selective culture of petunia and parthenocissus protoplasts. Plant Sci. Letters 5, 197 - 207

PRAT,R. and J.C. ROLAND, 1971: Etude ultrastructurale des premiers stades de neoformation d´ une enveloppe par les protoplasts vegetaux separes mecaniquement de leur paroi. C.R. Acd. Sc. Paris, 273, 165 - 168

RAJASEKHAR, E.W., 1973: Nuclear division in protoplasts isolated from pollen tetrades of Datura metel. Nature, 246, 223 - 224

RAVEH, D. and E. GALUN, 1975: Rapid regeneration of plants from tobacco mesophyll protoplasts plated at low densities. Z. Pflanzenphysiol. 76, 76 - 79

RAVEH, D., E. HUBERMAN and E. GALUN, 1973: In vitro culture of tobacco protoplasts: Use of the feeder techniques to support division of cells plated at low densities. In Vitro 9, 216 - 222

RAY, B. and J.M. HERR, 1970: The isolation of protoplasts from the placentalcells of Solanum nigrum. Protoplasma 69, 291 - 300

REINERT, J., 1958: Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten. Naturwiss. 45, 344 - 345

REINERT, J. 1973: Aspects of Organisation - Organogenesis and embryogenesis. pp. 338-355 In: Plant tissue and cell cultures ed by H.E. Street, Blackwell Scientific Publications LTD.

REINERT, J. und R.v.ARDENNE, 1964: Teilungswachstum isolierter Einzelzellen aus Vitis vinifera von benachbart wachsenden Geweben. Z. Naturf. 19 b, 1150 - 1156

REINERT, J. and S. HELLMANN 1971: Mechanism of the formation of polynuclear protoplasts from cells of higher plants. Naturwiss. 58, 419

REINERT, J. and S. HELLMANN, 1973: Aspects of nuclear division and cell wall formation in protoplasts from different origin. pp 272 - 279. In: Colloq. Internat. C.N.R.S. (Versailles) Editions de l´ Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.

REINERT, J., D. BACKS- HÜSEMANN and H. ZERBAN, 1971: Determination of embryo and root formation in tissue cultures from Daucus carota.pp. 261 - 268. In: Les cultures de tissues de plantes, Colloq. Internat. C.N.R.S. (Strasbourg)

REINERT, J., D. BACKS und M. KROSING, 1966: Faktoren der Embryogenese in Gewebekulturen aus Kulturformen von Umbelliferen.
Planta 68, 375 - 378

ROBENEK, H. und E. PEVELING, 1975: Veränderungen des Plasmalemmas während der Zellwandregeneration an isolierten Protoplasten aus dem Sproßkallus von Skimmia japonica Thumb.
Planta (Berl.) 127, 281 - 284

RUESINK, W.A., 1971: The plasmamembrane of avena coleoptile protoplasts.
Plant Physiol. 47, 192 - 195

RUESINK, A.W. and K.V. THIMANN, 1965: Protoplasts from avena coleoptile.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 54, 56 - 64

RUESINK, W.A. and K.V. THIMANN, 1966: Protoplasts: Preparation from higher plants.
Science 154, 196 - 199

RUSCH, H.P., N. SACHSENMAIER, K. BEHRENS and V. GRUTER, 1966: Synchronisation of mitosis by the fusion of the plasmodia of Physarum polycephalum.
J. Cell Biol. 31, 204 - 209

SCHENK, R.U. and A.C. HILDEBRANDT, 1969 a: Production of protoplasts from plant cells in liquid culture using purified commercial cellulases.
Crop Sci. 9, 629 - 631

SCHENK, R.U. and A.C. HILDEBRANDT, 1969: Osmotic and pH effect on production and survival of plant protoplasts.
Phyton 26, 155 - 166

SCHENK, R.U. and A.C. HILDEBRANDT, 1971: Production, manipulation and fusion of plant cell protoplasts, as a step towards somatic hybridisation. pp. 319 - 331. In : Les cultures de tissues de plantes. C.N.R.S. Strasbourg.

SCHIEDER, O. 1974: Selektion einer somatischen Hybride nach Fusion von Protoplasten auxotropher Mutanten von Spaerocarpus danelli. Aust.
Z. Pflanzenphysiol. 74, 357 - 365

SCHIEDER, O., 1975: Regeneration von haploiden und diploiden Datura innoxia Mill. Mesophyll Protoplasten zu Pflanzen. Z.Pflanzenphysiol. 76, 426 - 466

SCOWCROFT, W.R., M.R. DAVEY and J.B. POWER, 1973: Crown gall protoplasts - Isolation culture and ultrastructure. Plant Sci. Letters 1, 451 - 456

SHEPARD, J.F. and R.E. TOTTEN, 1975: Isolation and regeneration of tobacco mesophyll cells from protoplasts under low osmotic conditions. Plant Physiol 55, 689 - 694

SKOOG, F.,1944: Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. Am. J. Bot. 31, 19 - 24

SKOOG, F. and C.O. MILLER, 1957: Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro.

STUART, R. and H.E. STREET, 1969: Studies on growth in culture of plant cells. IV. The initiation of division in suspensions of stationary phase cells of Acer pseudoplatanus. L. J. Exptl. Bot. 20, 556 - 571

STEWARD, F.C., M.O. MAPES and J. SMITH, 1958: Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. Am. J. Bot. 45, 693 - 703

TAKEBE,I., G. LABIB and G. MELCHERS, 1971: Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwiss. 58, 318 - 321

TAKEBE, I. and Y. OTSUKI, 1969: Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 64, 843 - 848

TAKEBE, I. Y. OTSUKI and S. AOKI, 1968: Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. Plant & Cell Physiol. 9, 115 - 124

TAKEBE, I. Y. OTSUKI, Y. HOMDA, T. NISHIO and Ch. MATSUI, 1973: Fine structure of isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Planta (Berl.) 113, 21 - 27

TOISTER, Z. and A. LOYTER, 1971: Ca^{++} induced fusion of avian erythrocytes.
Biochimia et Biophysica Acta, 241, 719 - 724

UCHIMIYA, H. and MURASHIGE, T., 1974: Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells.
Plant Physiol. 54, 936 - 944

UCHIMIYA, H. and T. MURASHIGE, 1976: Influence of the nutrient medium on the recovery of dividing cells of tobacco protoplasts.
Plant Physiol. 57, 424 - 429

USUI, H., M. MAEDA and M. ITO, 1974: High frequency of spontaneous fusion in protoplasts from various plant tissues.
Bot. Mag. Tokyo 87, 179 - 182

VARDI, A., P. SPIEGEL- ROY and E. GALUN, 1975: Citrus cell culture: Isolation of protoplasts, plating densities, effect of mutagens and regeneration of embryos.
Plant Sci. Letters 4, 231 - 236

WALLIN,A. and T. ERIKSSON, 1973: Protoplast culture from cell suspensions of Daucus carota.
Physiol. Plant. 28, 33 - 39

WALLIN, A., K. GLIMELIUS and T. ERIKSSON, 1974: The induction of aggrgation and fusion of Daucus carota protoplasts by polyethylene glycol.
Z. Pflanzenphysiol. 74, 64 - 80

WATTS, J. W. and J.M. KING, 1973: The use of antibiotics in the culture of sterile plant protoplasts
Planta (Berl.) 113, 271 - 277

WATTS, J.W., F. MOTOYOSHI and J. M. KING, 1974: Problems associated with the preparation of stable protoplasts of cells of tobacco mesophyll.
Ann. Bot. 38, 667 - 671

WEISS, M.C. and H. GREEN, 1967: Human Mouse hybrid cell lines containing partial complements of human chromosomes and functioning human genes.
Proc. natn. Acad. Sci. (U.S.) 58, 1104 - 1111

WHITE, P.R., 1939: Controlled differentiation in a plant tissue culture.
Bull. Torrey bot. Club 66, 507 - 513

WHITE, P.R., 1954: The cultivation of animal and plant cells. Ronald Press, New York.

WILLISON, J.H.M. and E.C. COCKING, 1972: The production of microfibrils at the surface of isolated tomato fruit protoplasts.
Protoplasma 75: 397 - 403

WILLISON, J.H.M. and E.C. COCKING, 1975: Microfibril synthesis at the surface of isolated tobacco mesophyll protoplasts, a freeze - etch study.
Protoplasma 84, 147 - 159

WITHERS, L.A., 1973: Plant protoplast fusion: Methods and mechanisms. pp. 517 - 545 In: Colloq. Internat. C.N.R.S. (Versailles) Editions de l' Institut de la Recherche Agronomique, Paris.

WITHERS, L.A. and E.C. COCKING, 1972: Fine stuctural studies on spontaneous and induced fusion of higher plant protoplasts.
J. Cell Sci. 11, 59 - 75

WOOD, H.N. and A.C. BRAUN, 1961: Studies on the regulation of certain essential biosythetic systems in normal and grown gall tumor.
Proc. nat. Acad. Sci. (U.S.) 47, 1907 - 1913

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1973 - 1976 am Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie durchgeführt.
Ich danke Herrn Professor Reinert für die Überlassung des Arbeitsplatzes und sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

LEBENSLAUF

Am 23. Juni 1948 wurde ich als zweites Kind des Reedereikaufmanns Heinrich Gosch und seiner Ehefrau Ilse, geb. Hoffmann, in Hamburg geboren.

Ich wurde 1955 eingeschult und legte am 16.1.1968 an der Elise - Averdieck - Schule in Hamburg die Reifeprüfung ab.

Im April 1968 begann ich ein Apothekenpraktikum, welches ich 1970 mit der pharmazeutischen Vorprüfung abschloß. Zum Sommersemester 1970 immatrikulierte ich mich an der Freien Universität Berlin. Am 27.4. 1973 legte ich das pharmazeutische Staatsexamen ab und erlangte die Approbation als Apothekerin.

Im Juni 1973 begann ich mit meiner Doktorarbeit am Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie und war ab Oktober 1973 als wissenschaftliche Angestellte tätig.